

**LYPSYLEHMÄN NEGATIIVISEN ENERGIATASEEN
ENNUSTAMINEN MAIDON RASVAHAPPOPROFIILIN
PERUSTEELLA**

Sanna Kaksonen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden osasto
Kotieläintiede
2018

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion Faculty		Laitos Institution Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Maataloustieteiden osasto	
Tekijä Författare Author			
Sanna Kaksonen			
Työn nimi Arbetets titel Title			
Lypsylehmän energiataseen ennustaminen maidon rasvahappoprofiilin perusteella			
Oppiaine Läroämne Subject			
Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji Arbetets art Level	Aika Datum Month and year	Sivumäärä Sidoantal Number of pages	
Maisterintutkielma	Helmikuu 2018	63	
Tiivistelmä Referat Abstract			
<p>Tuotoskauden alussa lypsylehmän energian tarve kasvaa suuremmaksi kuin energian saanti. Negatiivisessa energiataseessa lehmä käyttää kehon rasvakudoksia energian lähteenä, jolloin plasman vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuus nousee. Näiden rasvahappojen otto maitorauhaseen on suoraan yhteydessä niiden pitoisuuteen plasmassa, joten maidon rasvahappokoostumusta voidaan käyttää negatiivisen energiataseen ja plasman NEFA-pitoisuuden ennustamiseen. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia maidon rasvahappoprofiilin ja yksittäisten rasvahappojen yhteyttä plasman NEFA-pitoisuuteen. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, voiko maidon keskipitkän infrapuna-analyysin (MIR) tuloksista ennustaa lehmän plasman NEFA-pitoisuuden, ja sitä kautta lehmän negatiivisen energiataseen.</p> <p>Tutkimus tehtiin osana Nordic Feed Efficiency- projektia. Aineisto kerättiin ajalta syyskuu 2013 – elokuu 2016 kolmesta tutkimuskarjasta. Tutkimukseen käytettiin ensimmäistä kertaa poikivia ayrshire- lehmii, joiden tietojen keräämistä jatkettiin mahdollisuuksien mukaan toisella tuotoskaudella. Ensimmäiseltä laktaatiokaudelta kerättiin 610 havaintoa 143 eri eläimestä, ja toiselta laktaatiokaudelta 199 havaintoa 49 eläimestä. Tilastollinen analyysi tehtiin SAS-ohjelmiston Mixed-proseduurilla. Korrelaatioanalyysillä tarkasteltiin plasman NEFA-pitoisuuden ja selittävien muuttujien välisiä yhteyksiä. Plasman NEFA-pitoisuus mallinnettiin regressioanalyysillä.</p> <p>Regressiomalleja tarkasteltiin erikseen molemmilta tuotoskausilta. Yksittäisistä rasvahapoista parhaiten lypsylehmien plasman NEFA-pitoisuuden kanssa korreloi molemmilla tuotoskausilla maidon C18:1c9-pitoisuus. C18:1c9-pitoisuuden ja tuotospäivän perusteella laskettu NEFA-pitoisuuden ennuste korreloi vahvasti havaitun NEFA-pitoisuuden kanssa korrelaation ollessa ensimmäisellä laktaatiokaudella 0,84 ja toisella 0,89. Tuotospäivän ja kahden rasvahapon pitoisuuden sisältävien ennustemallien selitysaste oli parempi kuin tuotospäivän ja yhden rasvahapon ennustemalleilla kaikissa malleissa. Kaksi rasvahappoa sisältävistä ennustemalleista NEFA-pitoisuutta ennustivat parhaiten mallit, joissa olivat mukana tuotospäivän lisäksi maidon C14:0- ja C18:1c9-pitoisuudet. Näiden mallien selitysasteet NEFA-pitoisuudelle olivat ensimmäisellä laktaatiokaudella 0,54 ja toisella laktaatiokaudella 0,69. Toisen tuotoskauden ennustemallien ennustevirhe (RMSE 0,08 mmol/L) oli pienempi kuin ensimmäisen tuotoskauden malleilla (RMSE 0,16 mmol/L). Muiden tekijöiden kuin rasvahappojen pitoisuuden lisääminen malliin ei tuonut merkittävää etua tai parannusta ennustemalliin. Ennustemallit aliarvioivat plasman suurimpia NEFA-pitoisuuksia, koska NEFA-pitoisuus heijastaa joissakin tapauksissa myös stressiä energiataseen lisäksi. Ennustemalleista voi silti päätellä lypsylehmän negatiivisen energiataseen olemassaolon ja vakavuuden, kun lehmän ruokinta on vastaavaa kuin tutkimuksessa käytetty.</p>			
Avainsanat Nyckelord Keywords			
Lypsylehmä, NEFA, energiatase, rasvahappo, MIR.			
Säilytyspaikka Förvaringsställe Where deposited			
Maataloustieteiden osasto			
Muita tietoja Övriga uppgifter Further information			
Työtä ohjasi yliopistonlehtori Tuomo Kokkonen			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos Institution Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä Författare Author Sanna Kaksonen			
Työn nimi Arbetets titel Title Predicting energy balance of a dairy cow based on milk fatty acid profile			
Oppiaine Läroämne Subject Animal nutrition science			
Työn laji Arbetets art Level Master's thesis	Aika Datum Month and year February 2018	Sivumäärä Sidoantal Number of pages 63	
Tiivistelmä Referat Abstract <p>Energy requirement of dairy cows can be higher than energy intake during early lactation. When energy balance is negative cows mobilize energy from body tissue. This increases the concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) in the plasma. NEFA uptake to mammary gland is directly related to the plasma NEFA concentration. Therefore, negative energy balance and the plasma NEFA concentration may be predicted from fatty acid concentration of the milk determined from mid-infrared (MIR) spectral data. The objective of this study was to analyze the relationship between milk fatty acid profile, single fatty acid concentrations and plasma NEFA concentration. In addition, the aim was to test, if the MIR spectrum results can be used in predicting plasma NEFA concentration and subsequently negative energy balance in dairy cows.</p> <p>This study was a part of the Nordic Feed Efficiency -project. Data were collected in three research farms from primiparous Nordic Red dairy cows between September 2013 and August 2016. Second lactation data were collected from the same cows when possible. There were 610 records from 143 primiparous cows, and 199 records from 49 cows in second lactation. Data were analyzed with Mixed- procedure of the SAS software. The association between the plasma NEFA concentration and predictor traits were studied with correlation analysis. Plasma NEFA concentration was predicted by using regression analysis.</p> <p>Regression models were examined separately for both parities. Among milk fatty acids C18:1c9 had the strongest correlation to plasma NEFA concentration in both lactations. Plasma NEFA concentration predicted based on the model including C18:1c9 concentration and days in milk (DIM) had a strong correlation with observed plasma NEFA concentration being 0.84 in first lactation and 0.89 in second lactation. Models including concentrations of two milk fatty acids and DIM had higher coefficients of determination than models including one fatty acid concentration and DIM. Best two fatty acid models included concentrations of C14:0 and C18:1c9 and DIM as predictor variables. The coefficients of determination for these models were 0.54 in first lactation and 0.69 in second lactation. Prediction error was smaller in second lactation models (RMSE 0.08 mmol/L) than in first lactation models (RMSE 0.16 mmol/L). Adding more prediction variables did not improve the models. Prediction models in this research underestimated the highest plasma NEFA concentrations, because in some cases plasma NEFA concentration can reflect stress in addition to negative energy balance. These models are useful and reliable in predicting existence and severity of negative energy balance of dairy cows with similar feeding as in this study.</p>			
Avainsanat Nyckelord Keywords Dairy cow, NEFA, energy balance, fatty acid, MIR.			
Säilytyspaikka Förvaringsställe Where Department of Agricultural Sciences		deposited	
Muita tietoja Övriga uppgifter Further information Supervisor: University lecturer Tuomo Kokkonen			

SISÄLLYS

LYHENTEET JA SYMBOLIT.....	6
1. JOHDANTO.....	7
2. Maidon rasvahappoprofiiliin vaikuttavat tekijät	8
2.1. Ravintoaineiden otto maitorauhaseen ja maitorasvan synteesi ..	8
2.2. Ravinnon vaikutus maidon rasvahappokoostumukseen.....	10
2.3. Rotu, laktaatiovaihe ja vuodenaika	11
3. ENENERGIATASE JA SEN INDIKAATTORIT.....	12
3.1. Maidon rasvahappojen määrittäminen	12
3.2. Energiataseen ennustaminen MIR-määritysten perusteella	13
3.3. Verestä määritetyt pitoisuudet energiataseen indikaattoreina...	15
3.4. Ennusteyhtälöiden rakentaminen	15
4. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	16
5. AINEISTO JA MENETELMÄT	17
5.1. Koejärjestelyt	17
5.1.1 Paikka, aika ja eläimet	17
5.1.2 Rehut, ruokinta ja lypsy.....	17
5.2. Mittaukset.....	18
5.2.1 Säilö- ja seosrehunkulutus	18
5.2.2 Väkirehunkulutus	18
5.2.3 Maitotuotos	19
5.2.4 Kuntoluokitus ja elopaino	19
5.3. Näytteenotto.....	19
5.3.1 Rehunäytteet.....	19
5.3.2 Verinäytteet.....	20
5.3.3 Maitonäytteet	20
5.4. Näytteiden käsittely ja analysointi	21
5.4.1 Rehunäytteet.....	21
5.4.2 Verinäytteet.....	22
5.4.3 Maitonäytteet	22
5.5. Energian tarve ja saanti	22
5.6. Tilastollinen analyysi	23
6. TULOKSET	24
6.1. Tunnusluvut.....	24
6.2. Maidon yksittäisten rasvahappojen pitoisuuden yhteys plasman NEFA-pitoisuuteen	27
6.3. Useamman kuin kahden selittäjän regressiomallit.....	32
6.3.1 Ensimmäinen laktaatiokausi.....	32
6.3.2 Toinen laktaatiokausi	38
7. TULOSTEN TARKASTELU	43
7.1. Maidon rasvahappoprofiilin fysiologinen tausta	43

7.2. Maidon yksittäisten rasvahappojen pitoisuuden yhteys plasman NEFA-pitoisuuteen.....	44
7.3. Tuotosvaiheen vaikutus maidon rasvahappoprofiiliin, energiataseeseen ja plasman NEFA-pitoisuuteen.....	46
7.4. Vaihtoehtoiset energiataseen ennustemallit.....	47
7.5. Ennustemallien vertailu	49
8. JOHTOPÄÄTÖKSET	51
9. KIITOKSET.....	52
LÄHTEET	53
LIITE 1. Aineiston NEFA- ja rasvahappopitoisuuksien keskiarvojen prosentuaaliset muutokset laktatiiviikoilla 2 ja 3 verrattuna laktatiiviikkoon 20.....	58
LIITE 2. Ensimmäisen laktatiivikauden rasvahappojen keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimi-arvot laktatiiviikoittain.....	59
LIITE 3. Toisen laktatiivikauden rasvahappojen keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimi-arvot laktatiiviikoittain.....	60
LIITE 4. Mitattujen ominaisuuksien korrelaatio plasman NEFA-pitoisuuteen laktatiivikausittain ja -viikoittain.....	61
LIITE 5. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selittävien tekijöiden korrelaatiot toisiinsa ensimmäisellä tuotoskaudella yhdistettynä laktatiiviikoilta 2 ja 3.....	62
LIITE 6. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selittävien tekijöiden korrelaatiot toisiinsa toisella tuotoskaudella yhdistettynä laktatiiviikoilta 2 ja 3.....	63

LYHENTEET JA SYMBOLIT

ACC	Asetyyli-CoA karboksylaasi
BHBA	β -hydroksivoihappo
CLA	Konjugoitunut linolihappo (conjugated linolic acid)
DIM	Tuotospäivä (Days in milk)
EKM	Energiakorjattu maitotuotos
NEFA	Vapaat rasvahapot (non-esterified fatty acid)
P-arvo	Tilastollinen merkitsevyys
r	Korrelaatiokerroin
RMSE	Keskivirhe
R ²	Selitysaste
VFA	Haihtuva rasvahappo (volatile fatty acid)

1. JOHDANTO

Lehmien maitotuotoksen lisäämiseen tähdännyt jalostus on lisännyt myös lehmien elopainoa ja syöntikykyä. Syöntikyky ei silti riitä kattamaan lehmien energiantarvetta lypsykauden alussa (Mäntysaari ja Mäntysaari 2010). Kun eläin saa vähemmän energiaa kuin se tarvitsee ylläpitoon, tuotokseen, kasvuun ja lisääntymiseen, on sen energiatase negatiivinen. Kun energiaa taas riittää käytön lisäksi varastoitavaksi kudoksiin, on energiatase positiivinen (McParland ym. 2011). Tiineyden loppuvaiheessa lehmän syöntikyky vähenee, joten poikimisen aikaan ja maidon tuotannon alkaessa lehmä ajautuu negatiiviseen energiataseeseen. Maitotuotoksen kasvaessa tuotoskauden alussa energian tarve kasvaa suuremmaksi kuin lehmän energian saanti rehusta, jolloin eläin käyttää kudoksiensa rasvavarastoista rasvahappoja ja glyserolia, sekä lihaksista aminohappoja lisäenergianlähteenä (Kokkonen ym. 2005, Mäntysaari ja Mäntysaari 2010, McParland ym. 2011). Vaikka lyhytkestoisena negatiivinen energiatase on nykypäivän korkeatuottoisille lehmille väistämätöntä, johtaa pitkään kestävä ja runsas kudosvarastojen mobilisointi usein aineenvaihdunnan häiriöihin, alentaa vastustuskykyä ja lisää sairastuvuutta, sekä viivästyttää kiimakiertojen käynnistymistä (Mäntysaari ja Mäntysaari 2010).

Yksilöllisen energiataseen laskemiseen tarvitaan tiedot eläimen rehun kuiva-aineen syönnistä ja rehujen koostumuksesta sekä tiedot lehmän painosta ja tuotoksesta. Näiden tietojen kerääminen on toistaiseksi hidasta, kallista ja hankalaa tai mahdotonta suurelta määrältä lehmiä tai tavallisella maitotilalla, joten tällä hetkellä niitä ei mitata päivittäin tai rutiininomaisesti karjantarkkailussa tai jalostusohjelmissa (McParland ym. 2012). Vaihtoehtoiset ja vähemmän maksavat tutkimustavat mittaavat muutoksia kehon koostumuksessa energiataseen määrittämiseksi. Näiden tutkimusmenetelmien ongelmana on tarve säännölliseen elopainon (BW) mittaukseen ja kuntoluokan (BCS) määrittämiseen, joista kumpikaan ei ole kaikilla lypsytiloilla välttämättä mahdollista säännöllisesti (McParland ym. 2011, Maurice- van Eijndhoven ym. 2013). Plasman kohonneet vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuudet ilmaisevat kudosten energian käyttöä lehmillä, ja ne samalla heijastavat lehmän energiatasetta (Van Knegsel ym. 2005, Gross ym. 2011, Jorjong ym. 2014). Myös NEFA-pitoisuuksien mittaaminen on kallista, ja tilatasolla verinäytteiden otto on työlästä ja hankalaa. On siis tarve kehittää joko epäsuora tapa mitata rehunsyöntiä, tai helppo ja luotettava mittaustapa energiataseelle (Mäntysaari ja Mäntysaari 2010, McParland ym. 2012).

Keskialueen-infrapunaspektroskopiaan (MIR) perustuva analyysi on rutiinikäytössä tilojen tuotosseurannassa. Aikaisemmissa tutkimuksissa on yritetty määrittää energiatasetta käyttämällä MIR-analyysistä saatuja maidon koostumustietoja, kuten rasva- ja valkuaispitoisuutta ja näiden suhdetta. Myös maidon rasvahappojen pitoisuuksia voidaan ennustaa MIR-spektrin perusteella. Tutkimuksissa on havaittu yhteys maidon rasvahappokoostumuksen ja energiataseen välillä. Etenkin tuotokauden alussa lehmän energiatase vaikuttaa maidon rasvahappokoostumukseen laskemalla keskipituisten ja nostamalla pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuuksia. Tämän takia maidon MIR-spektristä määritetty rasvahappokoostumus voi olla käytännöllinen, nopea ja halpa keino ennustaa lehmän energiatase (McParland ym. 2012, Maurice- van Eijndhoven ym. 2013).

2. Maidon rasvahappoprofiiliin vaikuttavat tekijät

Lehmänmaidon rasvasta noin 97 - 98 % muodostuu triglyserideistä, jotka taas koostuvat glyserolimolekyylisistä ja kolmesta siihen esteröityneestä rasvahaposta. Lehmänmaidossa on tyypillisesti noin 70 % tyydyttyneitä, 25 % tyydyttymättömiä ja 5 % monitydyttymättömiä rasvahappoja. Määrällisesti maidossa on noin 20 merkittävää rasvahappoa, kuitenkin noin 400 eri rasvahappoa on tunnistettu (Chilliard ym., 2000, Soyert ym. 2011). Tyydyttyneiden rasvahappojen määrästä eniten on C4:0-, 14:0-, C16:0- ja C18:0-rasvahappoja, tyydyttymättömistä rasvahapoista suurin pitoisuus on C18:1-rasvahappolla. Nämä viisi rasvahappoa kattavat noin 70 % kaikista maidon rasvahapoista (Bauman ja Griinari 2003, McDonald ym. 2011). Lehmänmaidon rasvahapot ovat peräisin rehun rasvahapoista, pötsin biohydrogenaatiosta ja mikrobien hajoamisesta, maitorauhasen de novo –synteesistä ja kehon rasvakudoksista (Chilliard ym. 2000). Maidon rasvakoostumuksen vaihteluun vaikuttaa eläimen perinnöllisten tekijöiden ja laktaatiovaiheen lisäksi myös ruokinta (McDonald ym. 2011).

2.1. Ravintoaineiden otto maitorauhasen ja maitorasvan synteesi

Lehmän elimistön rasvasynteesiin vaikuttavat lähtöaineet, energian riittävyys ja hormonit. Maitorasvan lähtöaineita ovat pötsissä muodostuvat haihtuvat rasvahapot (VFA), kehon rasvakudoksista tai ravinnosta saatavat vapaat rasvahapot (NEFA) ja maksan glukoneogeenisistä saatava glukoosi. Märehtijällä ei muodostu rasvahappoja glukoosista, mutta rasvahappojen esteröinnissä triglyserideiksi tarvitaan glukoosista

muodostettavaa glyseroli-3-fosfaattia. Pötsin mikrobien rehusta muodostamista haihtuvista rasvahapoista etikkahappo ja voihaposta pötsin seinämässä muunnettu β -hydroksivoihappo (BHBA) ovat esiaineita maidon lyhyt- ja keskipitkäketjuisille rasvahapoille (Chilliard ym. 2000, McDonald ym. 2011).

Maidon rasvasta muodostuu noin 60 % verestä otetusta triglyserideistä ja vapaista rasvahapoista, ja noin 40 % maitorauhasen de novo -synteesistä (Chilliard ym. 2000). Maitorasvan C4:0 - C14:0 -rasvahapot ja osa C16-rasvahapoista syntetisoidaan kokonaan maitorauhasessa. Lähtöaineina käytetään etikkahappoa 75 - 80 % ja BHBA:ia 15 - 20 %. Maitorasvan loput C16- ja kaikki C18-rasvahapot ja sitä pidemmät rasvahapot otetaan suoraan verenkierrosta, joten ne ovat peräisin suoraan joko rehusta tai kudoksista. Lehmän maidossa ja kudoksissa olevat parittoman hiilimäärän sisältävät rasvahapot ovat peräisin mikrobeista. Monityydyttymättömiä rasvahappoja ei tuoteta märehtijöiden kudoksissa, joten niiden määrä maidossa on kiinni niiden saannista rehusta. Lehmänmaidossa eniten on konjugoitunutta linolihappoa (CLA) C18:2cis9trans11 (rumeenihappo) isomeerina, mutta kokonaisuudessaan on löydetty lukuisia trans-isomeerejä (Chilliard ym. 2000, McDonald ym. 2011).

Maitorauhanen käyttää plasman vapaita rasvahappoja maidon rasvasynteesissä. Maitorauhasen kyky käyttää plasman lipoproteiinien rasvahappoja määräytyy lipoproteiinilipaasin (LPL) aktiivisuuden mukaan (Chilliard ym. 2000, McDonald ym. 2011). Veren plasman NEFA-pitoisuus on yhteydessä pääasiassa kehon rasvakudosten mobilisointiin ja hyödyntämiseen. Vapaiden rasvahappojen otto maitorauhaseen on taas suoraan yhteydessä niiden pitoisuuteen plasmassa. Märehtijän kudoksien varastoitujen triglyseridien rasvahapot ovat pääasiassa C16:0-, C18:0- ja C18:1c9-rasvahappoja, sekä vähemmissä määrin C14:0-, C16:1c9-, C17:0- ja C18:1trans11-rasvahappoja. Lisäksi esiintyy muita määrällisesti vähäisiä rasvahapporyhmiä (Chilliard ym. 2000, Jorjong ym. 2014, McParland ym. 2014).

Maitorasvasynteesin tärkeimmät entsyymit ovat asetyyli-CoA karboksylaasi (ACC) ja rasvahapposyntaasi (FAS). Täysin erilaistuneessa maitorauhasen erityssolussa on korkea δ -9 desaturaasiaktiivisuus, mikä muuttaa kudoksista vapautunutta steariinihappoa (C18:0) öljyhapoksi (C18:1cis9). Monityydyttymättömät rasvahapot saattavat vähentää δ -9 desaturaasin aktiivisuutta. Alle kahdeksantoista hiiliatomia sisältävillä rasvahapoilla δ -9 desaturaasin aktiivisuus on alhainen, joten suurin osa de novo -synteesissä syntyvistä

rasvahapoista on tyydyttyneitä (C4:0 - C16:0), vaikkakin pieni osuus C14:0- ja C16:0-rasvahapoista desaturoituu C14:1- ja C16:1-rasvahapoiksi (Chilliard ym. 2000, McDonald ym. 2011). Kun energiaa tulee ravinnosta liian vähän, katekoliamiinit ja kasvuhormoni lisäävät veren NEFA-pitoisuutta. Vapaat rasvahapot puolestaan estävät ACC:n toimintaa ja rasvahapposynteesiä etikkahaposta maitorauhasessa. Myös ravinnosta saatavat pitkäketjuiset rasvahapot estävät ACC:n toimintaa. Kun energian saanti on riittävää, insuliini lisää etikkahapon käyttöä rasvahapposynteesiin ja lisää rasvahappojen esterifikaatiota rasvakudoksissa, ja vähentää veren NEFA-pitoisuutta, mikä edelleen lisää ACC:n toimintaa. Insuliini, glukoosi ja glukoosin esiasteet vähentävät veren NEFA-pitoisuutta ja stimuloivat rasvasynteesiä BHBA:sta (McDonald ym. 2011).

2.2. Ravinnon vaikutus maidon rasvahappokoostumukseen

Märehtijöiden normaalin ruokavalion rasvapitoisuus on tyypillisesti noin 25-40g/ kg ka. Runsaasti rasvaa sisältäviä rehuja ovat esimerkiksi kaura ja rypsipuriste (40 - 60 ja 98 - 248 g/ ka kg). Nautojen rehut sisältävät eniten linoli- ja linoleenihappoja (C18:2 ja C18:3) (McDonald ym. 2011). Halmemies-Beauchet-Filleaun (2013) mukaan kohtuullinen rasvalisä (29 g lisättyä rasvaa/ väkirehukilo) ei laske säilörehun kuiva-aineen syöntiä tai maidontuotosta, mutta vaikuttaa maidon rasvahappokoostumukseen. Ravinnon rasvan vaikutuksia määrittävät ruokinnan rasvapitoisuus, rasvahappokoostumus ja rasvan antamismuoto (siemenet, puristeet, öljy tms.) sekä näiden tekijöiden yhdysvaikutukset perusruokavalion (karkearehu ja/tai väkirehu) kanssa. Pääsääntöisesti tyydyttyneiden rasvojen lisääminen ruokintaan lisää maidon rasvapitoisuutta ja tyydyttymättömien rasvojen lisääminen vähentää (Chilliard ym. 2000). Glukogeeniset ravintoaineet nostavat plasman glukoosi- ja insuliinipitoisuuksia ja laskevat NEFA- ja BHBA-pitoisuuksia, kun taas lipogeenisten ravintoaineiden lisääminen nostaa plasman NEFA- ja BHBA-pitoisuuksia ja laskee glukoosipitoisuutta. Lipogeeniset ravintoaineet yleisesti nostavat maidon rasvapitoisuutta ja laskevat vastaavasti valkuaispitoisuutta (Van Knegsel ym. 2005).

Tuoreen ruohon vapaat rasvahapot toimivat maidon rasvasynteesissä rasvahappojen lähteenä (Halmemies-Beauchet-Filleau 2013). Nurmikasvit ovat linoleenihapon päälähde. Heinän kuivaaminen laskee tehokkaasti C18:3-pitoisuutta, joten C18:3-rasvahapon imeytyminen on tuoreesta ruohosta suurempaa kuin kuivasta heinästä ja väkirehusta. Kasvilipidit vaikuttavat maidon rasvakoostumukseen tyypillisesti

vähentämällä de novo -synteesissä valmistettavia tyydyttyneitä rasvahappoja ja lisäämällä tyydyttymättömien pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuuksia (Chilliard ym. 2000, Halmemies-Beauchet-Filleau 2013). Väkirehuista ja lisärehuista pellavansiemenessä ja camelinassa on merkittäviä määriä C18:3-rasvahappoa, yli 50 % rasvahapposisällöstä. Niiden käyttöä rajoittaa niiden kuidun sulavuutta heikentävä vaikutus. Kuidun sulavuuden heikentyminen vähentää lipogeenisten rasvahappojen osuutta VFA:sta ja vähentää siten maitorasvasynteesin esiaineiden tuotantoa. Maidon rasvapitoisuus laskee huomattavasti kun ruokinnassa on vähän kuitua, paljon viljaa ja monityydyttymättömiä rasvalisiä (Chilliard ym. 2000).

Ruokinnoilla, jotka perustuvat karkea rehuun ja joissa ei ole rasvalisiä, on maitorasvan C18:2-rasvahapon pitoisuus välillä 2-3 g/ 100 g rasvahappoja. Pitoisuutta voidaan nostaa lisäämällä ruokintaan kapseloitua saflori- tai rypsiöljyä, tai auringonkukka-, soija-, tai puuvillansiemenöljyä. Paljon linolihappoa sisältävät kasviöljyt lisäävät tehokkaasti myös maidon CLA-pitoisuutta. (Chilliard ym. 2000).

2.3. Rotu, laktaatiovaihe ja vuodenaika

Maidon rasvahappokoostumuksessa on vaihtelua lehmärotujen ja karjojen välillä. Maurice- van Eijndhoven ym. (2013) havaitsivat rotujen välillä merkittäviä eroja maidon tyydyttymättömien pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuuksissa, mutta monissa lyhyt- ja keskiketjuisissa rasvahapoissa rotujen väliset erot pienenevät tai katosivat, kun rasvahappojen pitoisuus suhteutettiin rasvaprosenttiin. Maurice- van Eijndhovenin ym. (2013) tutkimuksessa jersey-rodun lehmien maidon lyhytketjuisten ja tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuudet olivat suurempia kuin muiden tutkimuksessa olleiden rotujen, kun taas groningen white headed-rodun lehmien maidon tyydyttyneiden ja C16:0-rasvahappojen pitoisuudet olivat pienempiä kuin muilla roduilla. Erot yli 16 hiiliatomia sisältävien pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuuksissa johtuivat lehmien erilaisesta ruokinnasta (Maurice- van Eijndhoven ym. 2013). Maidon CLA-pitoisuuteen lehmän rotu ei vaikuttanut merkittävästi (Chilliard ym. 2000).

Stoopin ym. (2009) mukaan laktaatiokauden vaihe vaikuttaa maidon rasvahappokoostumukseen. Esimerkiksi kolmannen tuotoskuukauden aikaan C6:0- – C14:0-rasvahappojen pitoisuudet ovat huipussaan ja C18-rasvahappojen pitoisuus alimmillaan (Soyert ym. 2011). Joissakin tutkimuksissa (Gross ym. 2011, Mäntysaari

ym, 2012) on kuitenkin arvioitu maidon rasvahappokoostumuksen vaihtelun johtuvan ennemmin energiataseesta kuin laktaatiovaiheesta. Vuodenaika vaikuttaa maidon rasvahappokoostumukseen suurelta osin ruokinnan kautta. Ruttenin ym. (2009) tutkimuksessa havaittiin suurin ero talven ja kesän maitojen rasvahappokoostumuksessa tyydyttymättömissä C18-rasvahapoissa, joiden pitoisuudet olivat kesällä suuremmat kuin talvella. Tämä johtunee enimmäkseen laidunkauden ruokinnasta. Tuore ruoho karkearehuna lisää maidon tyydyttymättömien C18-rasvahappojen pitoisuuksia verrattuna kuivaan heinään tai säilörehuun perustuvaan ruokintaan (Chilliard ym. 2000, Halmemies-Beauchet-Filleau 2013).

3. ENENERGIATASE JA SEN INDIKAATTORIT

Lypsylehmien energiatase on perinteisesti laskettu joko energian tarpeen ja saannin erotuksesta tai kehon energiavarastojen muutoksesta. Energian tarpeen, saannin ja käytön tarkka mittaaminen ei kuitenkaan ole mahdollista tällä hetkellä tavallisilla lypsykarjatiljoilla. Kehon energiavarastojen muutos on tavallisesti mitattu elopainon (BW) ja kuntoluokan (BCS) muutoksena. Elopainoon vaikuttaa ruuansulatuskanavan täyteisyys, ja kuntoluokka määritetään subjektiivisesti, joten ne eivät ole tarkkoja, eivätkä sovi lyhyen aikavälin mittauksiin (Clark ym. 2005, Friggens ym. 2007, McParland ym. 2012). Kolmas keino määrittää energiatasetta on tutkia veren metaboliittien tai maidon koostumuksen muutoksia (Reist ym. 2002, Kokkonen ym. 2005, Friggens ym. 2007).

3.1. Maidon rasvahappojen määrittäminen

Maidon rasvakoostumus voidaan määrittää tarkasti kaasukromatografilla. Menetelmä on kuitenkin laajempaan käyttöön liian kallis ja työläs. Keskialueen-infrapunaspektroskopia (MIR) on vaihtoehto kaasukromatografian käytölle. Sen etuna on helppokäyttöisyyden ja edullisuuden lisäksi kapasiteetti määrittää suuria näytemääriä (Soyert ym. 2006). Kalbrointiyhtälöiden perusteella MIR-spektriä voidaan käyttää ennustamaan lukuisia maidon laatuominaisuuksia. Monissa maissa MIR-spektriä käytetään virallisesti maitotilastoinnissa määritettäessä proteiinia, kaseiinia, rasvaa, laktoosia ja ureaa. Näiden lisäksi sen avulla voidaan määrittää rasvahappo- ja kivennäisainekoostumusta, hyytymisominaisuuksia, melamiinipitoisuutta ja ketoaineiden pitoisuuksia (Soyert ym. 2006).

MIR-spektristä saatu maidon rasvahappojen ennustettu pitoisuus on maidon rasvapitoisuuden ja rasvakoostumuksen yhdistelmä (Soyert ym. 2011, De Marchi ym. 2014). Ruttenin ym. (2009) mukaan kaikki suurina pitoisuuksina esiintyvät yksittäiset rasvahapot ja yhdistetyt ryhmät rasvahappoja voidaan ennustaa tarkasti MIR-analyysillä. Soyertin ym. (2006) ja De Marchin ym. (2014) tutkimuksissa ennustemallit tyydyttyneille lyhyt- ja keskiketjuisille rasvahapoille olivat erittäin tarkkoja ja C18:0-rasvahapolle kohtalaisen tarkkoja. C20:0-rasvahapon määrittämisessä tulokset eivät olleet tyydyttäviä. MIR-määrittämisessä saatiin hyvä ennustetulos C18:1- ja C18:1c9-rasvahapoille. C18:2-rasvahapon ennusteen tarkkuus oli alhainen tai keskitasoa. Rasvahapporyhmistä MIR-ennustemallit ovat erittäin tarkkoja tyydyttyneille ja kertatyydyttymättömille rasvahapoille. Monityydyttymättömien rasvahappojen ryhmä oli huonosti ennustettavissa MIR-mittauksella, eikä maidossa pieninä määrinä esiintyvien rasvahappojen pitoisuuksia voitu ennustaa tarkasti (Soyert ym. 2006, Rutten ym. 2009, De Marchi ym. 2014).

MIR-spektrien antamien ennusteiden tarkkuuteen vaikuttavat kerättyjen näytteiden ominaisuudet. Tärkeimmät huomioon otettavat asiat ovat lehmän rotu, laktaatiovaihe ja näytteidenottokausi. Vaihtelu MIR-ennusteen tarkkuudessa ei ole yhteydessä vain rasvahappokoostumukseen, vaan myös spektrin vaihteluun. Spektrin vaihtelun maksimointi on tehokas keino parantaa ennusteen tarkkuutta (Soyert ym. 2006, De Marchi ym. 2014). Suuri määrä havaintoja kalibrointiaineistossa lisää MIR-analyysin ennustetarkkuutta. Jos rasvahapon pitoisuus on pieni, ei havaintojen määrä kuitenkaan paranna sen ennustetarkkuutta. Jos rasvahappojen pitoisuus vaihtelee vuodenajan mukaan, tarvitaan lukuisia näytteitä eri ajoilta edustavan kalibrointiaineiston saamiseksi (Rutten ym. 2009).

3.2. Energiataseen ennustaminen MIR-määrittäysten perusteella

Tutkimuksissa on saatu melko tarkkoja tuloksia maidon MIR-spektrin yhteydestä lehmän energiataseeseen. McParland ym. (2011) raportoivat, että lehmän energiantaseen voi ennustaa rakentamalla ennusteyhtälön maitonäytteiden MIR-spektristä ennustetuista rasva- ja valkuaispitoisuudesta sekä maitotuotoksesta, kuiva-aineen syönnistä, elopainosta ja kuntoluokasta. Ennusteyhtälöllä lasketun energiataseen keskimääräinen ennustetarkkuus oli 0,75, kun energiatase määritettiin koko laktaatiokaudelta. Friggensin ym. (2007) tutkimuksen perusteella lehmien keskimääräisen energiataseen voi ennustaa eri tuotoskausille lineaarisella mallilla, jossa tuotospäivä sekä MIR:illä määritetyt maidon

rasva- ja valkuaispitoisuudet ovat selittävinä tekijöinä. Kun ennustemalli tehtiin maidon päivittäisistä koostumustiedoista, oli keskimääräinen ennustevirhe erittäin pieni. Alkulaktaatiossa ennustevirhe oli pienempi, kun käytettiin mallia joka oli kehitetty alkulaktaatiota varten, eikä koko laktaation mallia. Friggensin ym. (2007) esittämät ennustemallit sopivat ryhmäkohtaisen, eivät yksilöllisen, energiataseen ennustamiseen. Eri tuotanto-olosuhteissa ja ympäristöoloissa oleville lehmille pitää luoda omat yhtälönsä (Friggens ym. 2007, McParland ym. 2014). Aikaisemmissa tutkimuksissa ei ole ennustettu plasman NEFA-pitoisuutta maidon MIR-spektristä saatavien tietojen perusteella.

Heuerin ym. (2000) mukaan tarkan energiataseen ennusteen johtaminen MIR-spektristä vaatii joko yli 150 eläimen karjan tai kaikkien testipäivien tulosten kokoamisen myöhemmin yhteen tiedostoon. Reistin ym. (2002) tutkimuksen perusteella karjan energiataseen ennuste yksilöiden maitonäytteistä on käytännöllinen, jos karjassa on yli 100 kausiluontoisesti poikivaa lehmää, tai yli 400 lehmää, joiden poikimiset jakautuvat tasaisesti ympäri vuoden. Otoskoon pienentäminen laskee selvästi energiataseen ennustetarkkuutta (Reist ym. 2002). Rutiininomainen MIR-tietojen kerääminen ja tarkkailu antaa tietoa lehmien energiataseesta etenkin, jos karjassa tai yksilöissä tapahtuu muutoksia (McParland ym. 2012).

Rasva-valkuaisuus suhteen (FPR) käyttö energiataseen indikaattorina perustuu siihen, että negatiivisessa energiataseessa oleva lehmä käyttää kehon rasvoja, jolloin utareeseen tulee enemmän rasvahappoja ja rasvasynteesi utareessa lisääntyy. Samanaikaisesti fermentoituvien hiilihydraattien saanti on laskenut, mikä vähentää pötsin mikrobivalkuaisynteesiä. Tämä vähentää utareen aminohappojen saantia, jolloin maitovalkuaisen synteesi vähenee suhteessa rasvasynteesiin (Friggens ym. 2007, McParland ym. 2011). Buttchereitin ym. (2011) tutkimuksen perusteella FPR oli parempi energiataseen indikaattori alkulaktaatiossa tai negatiivisessa energiataseessa olevilla holstein-friisiläinen-rotuisilla ensikoilla kuin syönti, kuntoluokitus tai yksittäinen maidon komponentti. Heuerin ym. (2000) ja Friggensin ym. (2007) mukaan FPR:n ennustetarkkuus ei kuitenkaan ole hyvä verrattuna syöntiin ja elopainoon perustuviin ennusteisiin.

McParlandin ym. (2014) mukaan ketoosi nostaa asetonin ja BHBA:n pitoisuutta lehmän veressä ja maidossa, mikä voidaan ennustaa MIR-spektristä. Hyperketonemia voitaisiin

McParlandin ym. (2014) mukaan ennustaa paremmin käyttämällä asetoniin ja BHBA:iin perustuvia ennustemalleja kuin FPR:n perusteella. Clarkin ym. (2005) tutkimuksessa laidunruokinnalla olleiden lehmien maidon asetonipitoisuus selitti 41 % energiataseen vaihtelusta alkulaktaatiossa. Maidon asetonipitoisuus korreloi negatiivisen energiataseen kanssa ($r = 0,64$) ja plasman BHBA-pitoisuuden kanssa ($r = 0,89$) (Clark ym. 2005). Sen sijaan positiivisen energiataseen kanssa maidon asetonipitoisuus ei ollut korrelaatiossa. Tutkimuksessa maidon asetonipitoisuuden vaihtelu oli suurta lehmien välillä, joten tarvitaan useita maitonäytteitä, jotta saadaan vertailupohjaa ja luotettava ennuste. Säilörehun voihappopitoisuus voi vaikuttaa maidon asetonipitoisuuteen, jolloin energiataseen ennustemalliin pitää ottaa mukaan säilörehun laatu (Clark ym. 2005).

3.3. Verestä määritetyt pitoisuudet energiataseen indikaattoreina

Verestä määritetyt pitoisuudet voivat toimia energiataseen indikaattoreina. Reistin ym. (2002) tutkimuksessa veren plasman pitoisuuksista positiivisesti energiataseen kanssa korreloivat glukoosi, kolesteroli, urea, insuliini, IGF-1, trijodityroini ja tyroksiini. Negatiivisesti veren plasman pitoisuuksista energiataseen kanssa korreloivat NEFA, kreatiniini, albumiini, BHBA sekä kasvuhormoni. Clarkin ym. (2005) tutkimuksessa plasman BHBA- ja NEFA-pitoisuudet korreloivat negatiivisesti alkulaktaatiossa laidunruokinnalla olleiden lehmien energiataseen kanssa. Positiivisesti energiataseen kanssa korreloivat veren plasman glukoosi- ja IGF-1-pitoisuudet. Reistin ym. (2002) tai Clarkin ym. (2005) tutkimuksissa leptiini ei korreloinut energiataseen kanssa. Kokkosen ym. (2005) tutkimuksessa havaittiin plasman leptiinipitoisuuden olevan yhteydessä kehon rasvapitoisuuteen eikä arvioituun energiataseeseen aikaisessa laktatiossa olevilla lehmillä. Reistin ym. (2002) mukaan verinäytteiden ottaminen maitonäytteiden lisäksi ei parantanut karjatason energiataseen ennustetarkkuutta. Myös Clarkin ym. (2005) mukaan suurissa, seosrehuruokinnalla olevissa karjoissa maidosta saa saman tiedon kuin verinäytteistäkin. Verinäytteistä saatava tieto saattaa tuoda lisätietoa koeolosuhteissa, mutta ei sovi normaaliin maidontuotantoon.

3.4. Ennusteyhtälöiden rakentaminen

Ennustettaessa energiatasetta MIR-spektrin perusteella tilastollisissa analyysissä käytetään usein partial least squares (PLS)-mallinnusta. McParlandin ym. (2011) mukaan ennustettaessa energiatasetta MIR-spektrin perusteella ennusteyhtälöissä PLS-mallissa kannattaa käyttää enintään noin 20 selittävää tekijää ja laktatiokauden alussa enintään

12 tekijää. Jos selittäviä tekijöitä on liian vähän, mallista tulee yliparametrisoitu eikä sillä saada tuotettua tarpeeksi tarkkaa tai luotettavaa yhtälöä. Jos mallissa taas on liikaa selittäviä tekijöitä, on tietoja liian paljon vastaamaan kalibrointisarjaa. Yleisin esikäsittely MIR-spektrille on Savitzky-Golay derivointi (Soyert ym. 2011, DeMarchi ym. 2014). McParlandin ym. (2011) tutkimuksessa MIR-spektrin datan esikäsittely ei parantanut mallin selitystasetta, mutta muissa tutkimuksissa tästä on ollut jotain etua. Jotta luotettava yhtälö saadaan luotua, pitää MIR-spektri kalibroida aineistolla, joka kattaa tutkittavan populaation. Samaten validointidatan vaihtelu pitää olla edustettuna kalibrointisetissä. Eri tuotantoympäristöissä oleville lehmille pitää luoda omat yhtälöt, koska tarkkoja ennusteita saadaan vain, jos kalibrointi ja ennustemalli on tehty vastaavanlaisilla lehmillä (Rutten ym. 2009, McParland ym. 2012, Jorj Jong ym. 2014).

4. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tässä tutkielmassa käytetty aineisto kerättiin tutkimuksessa, joka oli osa pohjoismaisten yliopistojen ja tutkimuslaitosten Nordic Feed Efficiency (NFE) –projektia. Projektin tavoitteena on parantaa lypsylehmien rehuhyötysuhdetta jalostuksella ja ruokinnalla. Suomesta projektissa ovat mukana Luonnonvarakeskus (Luke) ja Helsingin yliopisto (HY). Rehuhyötysuhdeominaisuuksia mitattiin hankkeen yhteydessä Luken Jokioisten ja Maaningan sekä Helsingin yliopiston Viikin tutkimusnavetoissa. Lisäksi vertailuaineiston maitonäytteitä kerättiin Mustialan ja Ahlmanin karjoista.

Tämän tutkielman tavoitteena oli tutkia maidon rasvahappoprofiilin ja yksittäisten rasvahappojen yhteyttä plasman NEFA-pitoisuuteen. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, voiko maidon MIR-analyysin tuloksista ennustaa lehmän plasman NEFA-pitoisuuden, ja sitä kautta lehmän negatiivisen energiataseen. Hypoteesina oli, että maidon rasvahappoprofiilin ja rasvahappojen pitoisuuden perusteella voisi ennustaa lypsylehmien negatiivisen energiataseen.

5. AINEISTO JA MENETELMÄT

5.1. Koejärjestelyt

5.1.1 Paikka, aika ja eläimet

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksella. Tässä tutkielmassa käytetty aineisto kerättiin ajalta syyskuu 2013 – syyskuu 2016. Aineiston kerättiin Luken Jokioisten ja Maaningan, sekä HY:n Viikin tutkimusnavetoissa. Tutkimukseen valittiin ensimmäistä kertaa poikivia ayrshire-rotuisia lehmii, joista kerättiin tietoa koko ensimmäisen ja, mahdollisuuksien mukaan, toisen tuotoskauden ajan. Tietojen keruu aloitettiin heti poikimisen jälkeen ja sitä jatkettiin mahdollisimman pitkälle tuotoskauden aikana. Koelehmät pidettiin joko koeparsissa tai pihatossa. Tutkimukseen valitut lehmät olivat Viking red –sonnien jälkeläisiä, jotta NFE-projektin vaatimaa rehuhyötysuhteen geneettistä vaihtelua voitiin arvioida. Koelehmien määrät vaihtelivat laktaatiokausittain ja karjoittain (Taulukko 1.), ensimmäisen laktaatiokauden aineistoa kerättiin yhteensä 143 eri eläimestä, ja toisen laktaatiokauden aineistoa 49 eläimestä.

Taulukko 1. Koelehmien määrä karjoittain laktaatiokausilla.

	1. laktaatio	2. laktaatio
Jokioinen	103	43
Maaninka	16	0
Viikki	24	6
yht.	143	49

5.1.2 Rehut, ruokinta ja lypsy

Tutkimuksessa ei tehty ruokintaan liittyviä koetoimenpiteitä. Lehmät ruokittiin navetassa normaalisti käytettävillä ruokinnoilla; Viikissä osittaisella seosrehuruokinnalla, Jokioisilla väki- ja säilörehun erillisruokinnalla, ja Maaningalla kokeen alussa erillisruokinnalla ja toukokuusta 2014 alkaen seosrehuruokinnalla. Erillisruokinnan ja osittaisen seosrehuruokinnan väkirehumäärää ei sidottu tuotokseen. Nopeita ja lyhytaikaisia muutoksia ruokinnassa pyrittiin välttämään, eikä lehmille annettu erikoisrehuja, joilla olisi ollut tarkoitus vaikuttaa niiden energiataseeseen. Jos tutkimuksessa oleva lehmä poiki laidunkauden aikana, se pidettiin poikimisesta eteenpäin sisäruokinnassa. Lehmät lypsettiin Jokioisilla ja Maaningalla kaksi kertaa päivässä. Viikissä parressa pidetyt lehmät lypsettiin kaksi kertaa päivässä. Robotilla

lehmät saivat käydä vapaasti säädetyn lypsyvälin sallimissa rajoissa, ensikoilla oli robottikäyntejä keskimäärin 2,16 vuorokaudessa ja toisen kerran poikineilla 2,8.

5.2. Mittaukset

5.2.1 Säilö- ja seosrehunkulutus

Lehmien päivittäinen seos- ja säilörehunkulutus mitattiin automaattisesti vaakakupeilta rehukulutuksen seurantajärjestelmällä kaikilla kolmella tutkimustilalla. Vaakakuppijärjestelmä (Insentec RIC system, Insentec B.V., Marknesse, Alankomaat) tunnistaa eläimen korvassa olevan transponderin, rekisteröi kupissa olevan rehumäärän ja lähettää tiedon suoraan tietokoneelle, jolloin saadaan laskettua lehmäkohtainen rehun syönti. Rehukupit suljettiin aina ennen rehun poistamista tai lisäämistä. Säilö- tai seosrehu jaettiin automaattisesti kiskoruokkijalla. Pihattoihin rehu jaettiin Viikissä ja Maaningalla 4 – 6 kertaa päivässä (TMRsukkula, Pellon Group Oy, Ylihärmä, Suomi), Jokioisilla 4 kertaa päivässä (TR-400 Robot, Pellon Group Oy, Ylihärmä, Suomi). Viikissä koeparressa oleville lehmille seosrehu jaettiin kaksi kertaa päivässä, Maaningalla kerran päivässä. Vaakakupit huollettiin, kalibroitiin ja niiden toimintaa seurattiin tutkimuksen aikana. Kiskoruokkijan kalibrointi tarkistettiin tutkimuksen alussa ja sen jälkeen kuukausittain.

5.2.2 Väkirehunkulutus

Viikissä pihatossa olevat koelehmät saivat väkirehun lypsyn yhteydessä lypsyrobotilta. Väkirehunkulutusta seurattiin lypsyrobotin hallintaohjelman (T4C, Lely Holding S.à r.l., Maassluis, Alankomaat) kautta. Väkirehun annostuslaitteiden kalibrointi tarkastettiin tutkimuksen alussa ja sen jälkeen kuukausittain. Koeparressa olevat koelehmät saivat väkirehut lypsyn yhteydessä vaakakuppiin ripustettavasta väkirehukupista. Koeparren väkirehut punnittiin joka ruokintakerralle vaa'alla.

Jokioisilla ja Maaningalla erillisruokinnan aikana koelehmät saivat väkirehun takaportillisista kioskeista (Nedap, Nedap N.V., Groenlo, Alankomaat). Maaningalla myös seosrehuruokinnan aikana lehmät saivat jonkin verran väkirehua kioskilta (maksimissaan 4 kg ka), jotta lehmien elopaino saatiin mitattua.

5.2.3 Maitotuotos

Viikissä koeparressa olevat lehmät lypsettiin kaksi kertaa päivässä klo 6:15 ja 16:45 putkilypsimellä (DeLaval, Tumba, Ruotsi). Koeparressa lypsettyjen lehmien maitomäärät rekisteröitiin putkilypsimen maitomittarista (WB Auto Sampler, Tru-Test, Auckland, Uusi-Seelanti) ja kirjattiin tiedonkeruulomakkeella jokaiselta lypsykerralta. Viikissä pihatossa olevat koelehmät lypsettiin lypsyrobotilla (Astronaut A3, Lely Holding S.à.r.l., Maassluis, Alankomaat), josta lehmien tuotostiedot kerättiin lypsyrobotin hallintaohjelman avulla (T4C, Lely Holding S.à.r.l., Maassluis, Alankomaat).

Maaningalla ja Jokioisilla koelehmät lypsettiin lypsyasemalla (SAC, Kolding, Tanska) kahdesti päivässä, Maaningalla klo 6.00 ja 16.00, ja Jokioisilla klo: 6:30 ja 16:00. Maitotuotos mitattiin joka lypsykerralta.

5.2.4 Kuntoluokitus ja elopaino

Viikissä pihatossa olevien lehmien elopaino saatiin joka lypsykerralla lypsyrobotin tiedonkeruujärjestelmästä. Koeparressa pidetyt lehmät punnittiin eläinvaa'alla (CV 9600 Scale, Solotop Oy, Helsinki, Suomi) viikoittain kahtena peräkkäisenä päivänä. Lehmien kuntoluokka määritettiin ensimmäisellä poikimisen jälkeisellä viikolla, ja sen jälkeen kuukauden välein. Kuntoluokituksen teki yksi henkilö Edmonsonin ym. (1989) menetelmällä asteikolla 1-5 0,25 yksikön tarkkuudella.

Jokioisilla ja Maaningalla lehmät punnittiin päivittäin väkirehukioskeissa. Jos lehmä oli parressa, sitä käytettiin väkirehukioskissa punnituksessa kahden viikon välein kahtena peräkkäisenä päivänä. Kuntoluokka (Edmonson ym. 1989) määritettiin ensimmäisen kerran poikimisen jälkeisellä viikolla, minkä jälkeen se määrittivät kerran kuukaudessa kaksi henkilöä, joiden saamista tuloksista laskettiin keskiarvo.

5.3. Näytteenotto

5.3.1 Rehunäytteet

Viikissä säilörehusta otettiin näyte kaksi kertaa viikossa. Samaa erää olevat säilörehunäytteet yhdistettiin enintään kuukauden jaksoissa. Jokioisilla ja Maaningalla säilörehusta otettiin näyte kerran viikossa ja näytteet yhdistettiin kahden viikon jaksoissa. Väkirehusta otettiin näyte kerran viikossa kaikissa tutkimusnavetoissa. Viikissä täys- ja

valkuaisrehunäytteet yhdistettiin yhdeksi, koko rehuerää edustavaksi analyysinäytteeksi, ja seosrehun väkirehunäytteet yhdistettiin analyysia varten kuukauden jaksoissa. Jokioisilla ja Maaningalla väkirehunäytteet yhdistettiin kuukausinäytteiksi väkirehulaaduittain.

5.3.2 Verinäytteet

Kokeessa olevilta lehmiltä kerättiin verinäytteet häntäsuonesta tuotosviikoilla 2 ja 3 kahtena päivänä, ja tuotosviikolla 20 yhtenä päivänä NEFA-pitoisuuden määrittämistä varten. Verinäytteen ottamispäivänä otettiin lehmiltä myös maitonäyte sekä aamu- että iltalypsystä. Verinäyte otettiin välittömästi aamulypsyn jälkeen 10 ml EDTA-putkeen. Viikissä pihatossa oleville lehmille laitettiin näytteenottoa edeltävänä iltana lypsyrobotille lypsyrajoitus. Aamulla lehmä vietiin lypsyyn valvotusti, minkä jälkeen se ohjattiin hoitokarsinaan verinäytteen ottoa varten.

5.3.3 Maitonäytteet

Koelehmiltä otettiin maitonäytteet tuotosviikoilta 2 ja 3 kahtena päivänä viikossa ja tuotosviikolla 20 yhtenä päivänä viikossa sekä aamu- että iltalypsyltä. Viikissä illan maitonäyte otettiin lypsyrobotilta aamunäytteenottoa seuraavalta lypsyltä. Maitonäytteet otettiin tuotosseurantanäytteiden pikareihin, joissa oli säilöntäainepilleri (Bronopol, Valio, Helsinki, Suomi). Tutkimuksessa käytettiin aamulypsyn näytteiden analyysituloksia. Havaintoja kerättiin ensimmäiseltä laktaatiokaudelta yhteensä 610 ja toiselta laktaatiokaudelta 199 (Taulukko 2.).

Taulukko 2. Aineiston maito- ja verinäytteiden havaintomäärät laktaatioviikoittain ja karjoittain.

Lakt 1.	Lv2	Lv3	Lv20	yht.	Lakt 2.	Lv2	Lv3	Lv20	yht.
Karja 1.	184	185	96	465	Karja 1.	67	70	38	175
Karja 2.	39	47	11	97	Karja 2.	12	12	0	24
Karja 3.	22	22	4	48	Karja 3.	0	0	0	0
yht.	245	254	111	610	yht.	79	82	38	199

Kalibrintiaineiston maitonäytteet kerättiin Suomesta sisäruokintakaudelta 2013 - 2014 sekä kesän laidunkaudelta 2014. Tavoitteena oli kerätä 500 mahdollisimman vaihtelevaa maitonäytettä (250 sisäruokintakaudelta ja 250 laidunkaudelta). Näytteet kerättiin

erirotaisista lehmistä, eri karjoista (geneettisistä linjoista), tuotantotavoista, laktaatiokausilta ja – vaiheista, sekä eri vuodenaikoina. Näytteet kerättiin edellä mainittujen tutkimusnavetoiden lisäksi Ahlmanin ja Mustialan oppilaitosten karjoista. Jokaiselta eläimeltä otettiin kerralla kolme 50 ml maitonäytettä, aikaisemmin kuvatulla tavalla.

5.4. Näytteiden käsittely ja analysointi

Viikin karjan rehunäytteiden ja kaikkien karjojen verinäytteiden kemialliset koostumukset analysoitiin Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa. Jokioisten ja Maaningan rehunäytteiden kemialliset koostumukset analysoitiin Luken laboratoriossa Jokioisilla. Maitonäytteet analysoitiin Valio Oy:n Seinäjoen aluelaboratoriossa.

5.4.1 Rehunäytteet

Säilörehusta tehtiin primäärinen kuiva-ainemääritys vähintään kerran viikossa sekä aina, kun rehun laadussa havaittiin muutos. Primäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla näytettä 24 tuntia 105°C:ssa, haihtuvien yhdisteiden osalta kuiva-aineen korjaus tehtiin Huidan ym. (1986) mukaan. Säilörehusta analysoitiin tuhka, raakavalkuainen, raakarasva, neutraalidetergenttikuitu (NDF) ja D-arvo sekä laskettiin energia-arvo (ME, MJ/kg ka). Erikoisanalyysinäytteestä analysoitiin haihtuvat rasvahapot, maitohappo, etanoli, ammoniumtyppi ja sokeripitoisuus. Sekundäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla primaarisen kuiva-aineen näytteet uudestaan 105°C:ssa 16 tuntia. Säilörehun orgaaninen aine määritettiin AOAC (1990) standardianalyysien mukaan. NDF määritettiin Van Soestin ym. (1991) menetelmällä. Luken laboratoriossa säilörehun raakavalkuainen määritettiin Leco FP 428 tyypianalyysaattorilla (Leco Corporation, St Joseph, MI 49085, USA) (AOAC 1990). HY:n laboratoriossa säilörehun raakavalkuainen määritettiin Kjeldahl-menetelmällä (AOAC 1995). D-arvo määritettiin in vitro – sellulaasimenetelmällä Friedelin ym. (1990) menetelmän modifikaationa (Nousiainen ym. 2003). Laskennassa käytettiin korjauskaavoja, jotka perustuvat in vivo -sulavuuskokeisiin (Huhtanen ym. 2006).

Väkirehunäytteistä määritettiin primäärinen kuiva-aine ja kuivattiin analyysinäyte. Analyysinäytteestä määritettiin sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, raakavalkuainen, NDF ja tuhkaton NDF sekä laskettiin ME, ohutsuolesta imeytyvä valkuainen, pötsin

valkuaistase ja muiden hiilihydraattien kuin kuidun määrä. Analysoinnissa käytettiin samoja menetelmiä kuin säilörehunäytteissä. Väkirehujen muuntokelpoinen energia-arvo laskettiin koostumuksen perusteella rehutaulukkojen kaavalla. Kaupallisten täysrehujen osalta käytettiin valmistajan ilmoittamaa energiapitoisuutta.

5.4.2 Verinäytteet

Verinäytteet pidettiin jäähauteessa plasman erottamiseen asti. Plasma erotettiin sentrifugoimalla, jonka jälkeen erotettu plasma pipetoitiin neljään Eppendorf- putkeen, noin 1 ml/ putki, kuitenkin vähintään 0,5 ml /putki. Maanigan ja Jokioisten plasmanäytteet lähetettiin pakastettuna HY maa- ja metsätieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratorioon analysoitavaksi. Verinäytteistä määritettiin plasman vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuus entsyymaattisella, kolorimetrisellä asyyli-KoA-syntetaasi menetelmällä (NEFA-HR(2), Wako Chemicals GmbH, Neuss, Saksa).

5.4.3 Maitonäytteet

Näytteet säilytettiin kylmiössä, kunnes ne lähetettiin Valio Oy:n Seinäjoen aluelaboratorioon MIR-analyysiin (Milco Scan FT 6000, Foss, Hillerød, Tanska). Kaikista maitonäytteistä määritettiin rasva-, valkuais- ja laktoosipitoisuudet, urea- ja solumäärät sekä rasvahappokoostumus.

Kerätyistä kolmesta maitonäytteestä kaksi pakastettiin Belgiassa tehtyä kaasukromatografista määritystä varten. Yksi maitonäyte lähetettiin tuoreena Valio Oy:n Seinäjoen aluelaboratorioon MIR-analyysiä varten. MIR-analyysien tulokset (spektri) lähetettiin Belgiaan, jossa niistä valittiin 100 vaihtelevinta näytettä. Valitut pakastetut näytteet lähetettiin Belgiaan kaasukromatografiseen analyysiin. Suomessa kerätyillä näytteillä täydennettiin jo olemassa olevaa, OptiMIR-projektissa (<http://www.optimir.eu/project.html>) kerättyä kalibarointiaineistoa.

5.5. Energian tarve ja saanti

Eläinten energian tarve (MJ ME/pv) laskettiin Luonnonvarakeskuksen rehutaulukoiden (Luke, 2015) laskentaohjeiden mukaan. Eläinten energian saanti laskettiin mitatun

syönnin ja rehujen laskettujen tai ilmoitettujen ME-pitoisuuksien perusteella, käyttäen energian saannin korjausyhtälöä.

Energiakorjattu maitotuotos (EKM, kg/pv) laskettiin Sjaunjan ym. (1991) mukaan kaavalla:

maito (kg) * (383 * rasva (%) + 242 * valkuainen (%) + 165,4 * laktoosi (%) + 20,7)/3140.

Energiatase laskettiin:

energian saanti – (energian tarve ylläpitoon + energian tarve maidontuotantoon) MJ ME/pv.

5.6. Tilastollinen analyysi

Aineiston tilastollinen analyysi suoritettiin SAS-ohjelmiston MIXED – proseduurilla käyttäen satunnaisregressiomallia. Lehmä karjan ja laktaation sisällä oli mallissa satunnaistekijänä (St-Pierre, 2001). Malleihin sisällytettiin leikkauspiste sekä kiinteänä että satunnaistekijänä. Yhden rasvahapon regressiomalleissa selittävinä tekijöinä olivat rasvahapon pitoisuus maidossa ja tuotospäivä (DIM), selitettävänä tekijänä oli plasman NEFA-pitoisuus. Kahden tai useamman rasvahapon pitoisuuksia sisältäviin regressiomalleihin valittiin parhaiten NEFA-pitoisuuden kanssa korrelaatioissa (Liite 4.) olevat rasvahapot, jotka korreloivat toistensa kanssa mahdollisimman vähän (Liite 5 ja 6). Selittävien muuttujien välistä korrelaatiota (multikollinearisuus) arvioitiin SAS-ohjelmiston REG-proseduurin VIF-option (variance inflation factor) avulla. Mikäli VIF-arvo oli yli 10, selittävien muuttujien välinen korrelaatio arvioitiin liian voimakkaaksi. Rasvahappojen lisäksi selittävinä muuttujina testattiin tuotosta (EKM) ja ME-saantia (MEI), maidon rasva- ja valkuaispitoisuutta, maidon rasvapitoisuutta, maidon rasva-valkuaisuhdetta sekä energiatasetta. Usean muuttujan regressiomalleissa selittävinä tekijöinä olivat valittu muuttujien yhdistelmä ja DIM, selitettävänä muuttujana oli plasman NEFA-pitoisuus. Mallin random-lauseessa käytettiin rakenteetonta kovarianssimatriisia. Mallien valintakriteereinä käytettiin korjattua selitysasetta ja Akaiken informaatiokriteeriä. Pearsonin korrelaatiot NEFA-pitoisuuden ja maidon rasvahappojen pitoisuuksien, sekä NEFA-pitoisuuden ja muiden lehmästä ja maidosta mitattujen ominaisuuksien välillä laskettiin SAS-ohjelmiston (SAS 9.4., SAS Institute Inc., Cary, NC.) PROC CORR- proseduurin avulla.

6. TULOKSET

Regressiomalleja tarkasteltiin erikseen molemmille tuotokausille laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetystä aineistosta, koska alustavassa analyysissä tuotokauden ja rasvahappojen pitoisuuksien vaikutusten välillä oli tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus. Lehmien keskimääräinen energiatase oli positiivinen laktaatioviikolla 20 (Taulukko 3). Siten viikolla 20 otetun verinäytteen NEFA-pitoisuutta pidettiin perustasona. Perustason NEFA-pitoisuuden vähentäminen laktaatioviikkojen 2 ja 3 NEFA-pitoisuudesta ei tuonut malleihin muutosta ja olisi laskenut havaintojen määrää, joten mallit muodostettiin suoraan laktaatioviikkojen 2 ja 3 tiedoista. Laktaatioviikkojen 2 ja 3 havaintojen määrä oli ensimmäisellä laktaatiokaudella 499 ja toisella laktaatiokaudella 160.

6.1. Tunnusluvut

Toisen tuotokauden kokonaissyönti ja maitotuotos olivat suuremmat kuin ensimmäisellä tuotokaudella (Taulukko 3). Ensimmäisellä tuotokaudella lehmien keskimääräinen maitotuotos (EKM, kg/pv) nousi maltillisesti laktaatioviikolle 20 asti, kun taas toisella tuotokaudella alkuvuikkojen maitotuotos oli suurempi kuin laktaatioviikolla 20. Keskimäärin toisen tuotokauden maitotuotos oli noin 10 kg EKM/pv enemmän kuin ensimmäisessä laktaatiossa. Kokonaissyönti kasvoi molemmilla tuotokausilla viikolle 20 asti. Ensimmäisellä tuotokaudella syönti kasvoi toisen laktaatioviikon tasosta 6 kg ka/pv viikkoon 20 mennessä. Toisella tuotokaudella syönti oli alussa 4,5 kg ka/pv suurempi kuin ensimmäisellä tuotokaudella, ja kasvoi toisen laktaatioviikon lukemasta kokonaisuudessa 4,7 kg ka/pv viikolle 20. Kokonaissyönnin hajonta oli molemmilla tuotokausilla samaa suuruusluokkaa kaikilla laktaatioviikoilla. Lehmien elopaino oli ensimmäisellä tuotokaudella keskimäärin 575 - 580 kg ja toisella kaudella 634 - 649 kg. Molemmilla tuotokausilla paino laski alkulaktaatiosta viikolle 20, ensimmäisellä kaudella noin 5 kg ja toisella kaudella noin 14 kg. Ensimmäisellä kaudella painon muutos oli kääntynyt hienoiseen nousuun viimeisessä mittauksessa. Kuntoluokka laski molemmilla tuotokausilla ensimmäiseltä havaintoviikolta viikolle 20 yhteensä noin 0,3 yksikköä.

Ensimmäisessä laktaatiossa lehmien energiatase oli keskimäärin -36,6 MJ ME/pv laktaatioviikolla 2, josta se nousi positiiviseksi viikolle 20 (8,7 MJ ME/pv). Toisessa

laktaatiossa energiatase oli huomattavasti negatiivisempi tuotoskauden ensimmäisten viikkojen aikana, sekä vähemmän positiivinen viikolla 20 kuin ensimmäisessä laktaatiossa. Toisen laktaatiokauden negatiivisempi energiatase ei kuitenkaan näkynyt lehmien plasman NEFA-pitoisuuksissa, jotka olivat laktaatioviikoilla 2 ja 3 suuremmat ensimmäisellä tuotoskaudella kuin toisella tuotoskaudella. NEFA-pitoisuuksien perustasot viikolla 20 olivat molemmilla laktaatiokausilla samalla tasolla. Maidon rasvapitoisuus noudatti molemmilla tuotoskausilla samaa trendiä, eli laski alkulaktaation huippulukemasta noin 0,4 g/100 ml viikolle 20.

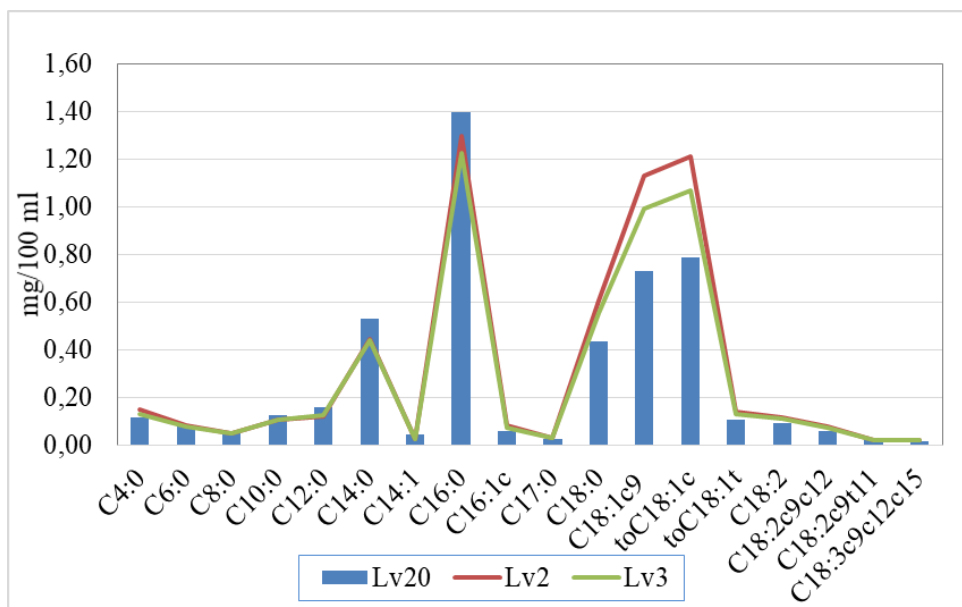
Tarkasteltaessa plasman NEFA-pitoisuuden nousua tuotosviikoilla 2 ja 3 verrattuna tuotosviikon 20 tasoon, oli molemmilla laktaatiokausilla prosentuaalinen muutos suurinta toisella laktaatioviikolla, minkä jälkeen ero viikon 20 perustasoon pieneni (Liite 1).

Taulukko 3. Aineiston tunnuslukujen tilastollinen kuvailu laktaatiokausittain ja -viikoittain.

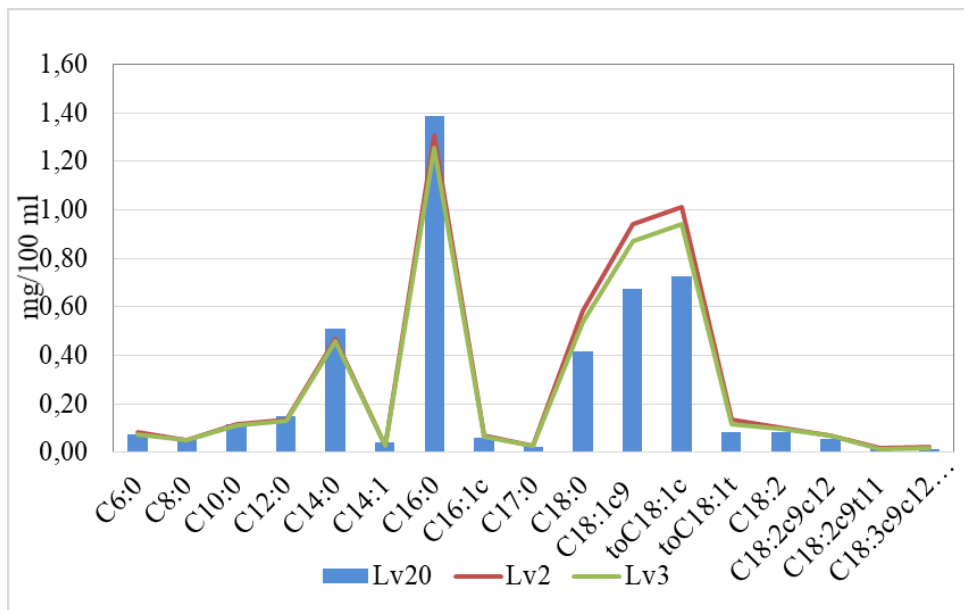
	1. laktaatio					2. laktaatio				
Laktaatioviiikko 2.	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi
EKM tuotos, kg/pv	245	27,3	4,8	14,6	40,2	78	38,8	6,4	21,9	62,4
Kokonaissyönti, kg ka/pv	242	15,2	2,5	6,3	25,2	79	19,9	2,5	12,0	25,4
Elopaino, kg	245	580	58	466	717	79	649	64	543	783
Kuntoluokka	241	3,41	0,33	2,50	4,42	79	3,18	0,32	2,50	4,25
Energiatase, MJ ME/pv	242	-36,6	27,1	-110,4	36,6	78	-50,3	40,0	-171,8	53,5
NEFA, mmol/L	245	0,60	0,32	0,16	1,95	79	0,47	0,18	0,13	1,08
Maidon rasvapitoisuus, g/100 g	245	4,62	0,76	1,94	10,14	79	4,44	0,56	2,99	6,66
Maidon valkuaispitoisuus, g/100 g	245	3,81	0,31	3,00	4,65	78	3,91	0,32	3,08	4,62
Rasva-valkuaisuhde	244	1,19	0,18	0,50	1,87	79	1,12	0,19	0,89	2,22
Laktaatioviiikko 3.	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi
EKM tuotos, kg/pv	254	29,2	5,3	11,9	46,3	82	40,7	5,7	27,9	58,4
Kokonaissyönti, kg ka/pv	254	16,7	2,6	7,8	26,1	82	22,0	2,7	12,4	27,2
Elopaino, kg	254	574	54	467	712	81	643	57	540	775
Kuntoluokka	250	3,36	0,31	2,06	4,36	82	3,15	0,32	2,50	4,25
Energiatase, MJ ME/pv	254	-30,1	30,1	-94,9	62,8	81	-39,1	38,5	-148,3	48,8
NEFA, mmol/L	254	0,46	0,25	0,10	1,63	82	0,40	0,16	0,13	0,89
Maidon rasvapitoisuus, g/100 g	254	4,29	0,81	0,93	7,33	82	4,20	0,65	2,42	5,80
Maidon valkuaispitoisuus, g/100 g	254	3,55	0,27	2,80	4,45	82	3,56	0,29	2,79	4,47
Rasva-valkuaisuhde	252	1,20	0,22	0,38	1,99	82	1,16	0,18	0,72	1,66
Laktaatioviiikko 20.	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi	N	Ka	Hajonta	Minimi	Maksimi
EKM tuotos, kg/pv	99	29,8	4,4	17,9	39,7	37	37,8	5,3	27,1	46,9
Kokonaissyönti, kg ka/pv	99	21,2	2,7	12,7	27,4	37	24,6	2,4	16,9	29,7
Elopaino, kg	99	575	51	447	727	37	634	58	548	775
Kuntoluokka	99	3,12	0,31	2,07	3,86	37	2,89	0,34	2,19	3,48
Energiatase, MJ ME/pv	99	8,7	21,3	-48,2	58,1	37	1,7	26,4	-53,2	62,8
NEFA, mmol/L	111	0,13	0,07	0,04	0,42	38	0,13	0,04	0,07	0,24
Maidon rasvapitoisuus, g/100 g	111	4,18	0,61	3,02	6,61	38	4,05	0,59	2,52	5,24
Maidon valkuaispitoisuus, g/100 g	99	3,56	0,24	3,01	4,28	37	3,50	0,22	3,07	3,92
Rasva-valkuaisuhde	111	1,16	0,16	0,86	1,93	38	1,13	0,16	0,68	1,47

6.2. Maidon yksittäisten rasvahappojen pitoisuuden yhteys plasman NEFA-pitoisuuteen

Molempien tuotokausien laktaatioviikoilla 2 ja 3 yksittäisistä rasvahaposta positiivisimmin NEFA-pitoisuuden kanssa korreloi C18:1c9-rasvahappo, ja negatiivisimmin C12:0-rasvahappo (Liite 4). Tuotosominaisuuksista NEFA-pitoisuuden kanssa positiivisimmin korreloi ensimmäisellä tuotokaudella maidon rasvapitoisuus, ja toisella tuotokaudella EKM. Molemmilla tuotokausilla laskennallinen energiatase korreloi negatiivisesti NEFA-pitoisuuden kanssa. Toisella tuotokaudella korrelaatiot olivat voimakkaammat kuin ensimmäisellä. C18:1c9-rasvahapon vaihtelu oli yksittäisistä rasvahapoista suurinta sekä määrällisesti että prosentuaalisesti (Liite 1) verrattaessa laktaatioviikkoja 2 ja 3 perustasaan, varsinkin ensimmäisessä laktaatiossa (Kuva 1). Toisella tuotokaudella vaihtelu oli pienempää kuin ensimmäisessä laktaatiossa, mutta edelleen selkeää (Kuva 2). Laktaatioviikkojen 2 ja 3 rasvahappoprofiilit olivat samankaltaisia molemmissa laktaatioissa, mutta kolmannella viikolla suurimmat muutokset alkoivat tasaantua lähemmäs perustasoa. Suurimmat erot alkulaktaation ja viikon 20 perustason rasvahappopitoisuuksien välillä olivat C18:1c9-rasvahapon ja C18:1-rasvahapporyhmän pitoisuuksien kasvu. Myös C18:0-pitoisuuden nousu, ja C14:0- ja C16:0-rasvahappojen pitoisuuden lasku olivat selkeästi havaittavissa, mutta erot olivat pienempiä kuin C18:1c9-rasvahapon kohdalla.



Kuva 1. Rasvahappojen pitoisuudet (mg/100 ml maitoa) eri laktaatioviikoilla ensimmäisessä laktaatiossa.



Kuva 2. Rasvahappojen pitoisuudet (mg/100 ml maitoa) eri laktaatioviikoilla toisessa laktaatiossa.

Toisella tuotoskaudella oli prosentuaalisesti (Liite 1) C18:1c9-rasvahapon lisäksi muitakin yksittäisiä rasvahappoja (C18:0, C18:2c9t11 ja C18:3c9c12c15), joiden pitoisuus nousi prosentuaalisesti huomattavasti viikoilla 2 ja 3, kun NEFA-pitoisuus oli suuri. Nämä rasvahapot toimivat regressiomallinnuksessa melko hyvin, mutta pitoisuus maidossa oli kuitenkin pieni verrattuna C18:1c9-rasvahapon pitoisuuteen. Rasvahappojen ja rasvahapporyhmien pitoisuuksien keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimi-arvot on esitetty liitteissä 2 ja 3.

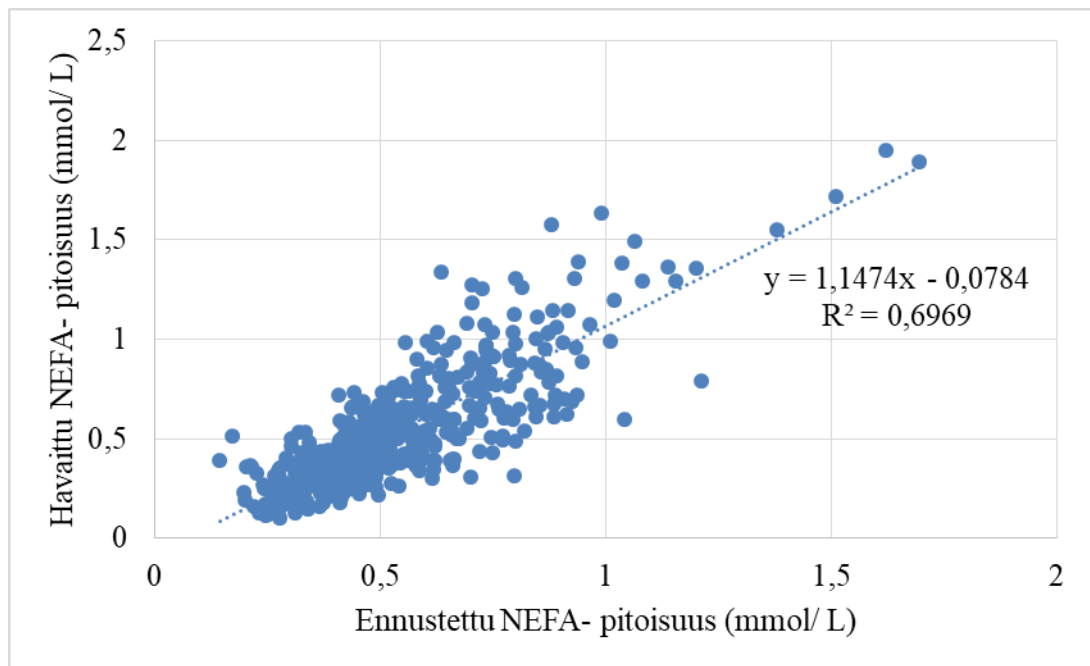
Plasman NEFA-pitoisuuden (mmol/L) ja maidon eri rasvahappojen pitoisuuden (mg/100 ml) välistä lineaarista regressiota tarkasteltiin erikseen molemmilta tuotoskausilta laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistettyssä aineistossa (Taulukot 4 ja 5). Regressiomallin selittävinä tekijöinä olivat tuotospäivä (DIM) ja rasvahappo sekä satunnaistekijöinä leikkauspiste ja rasvahappo. Molemmilla tuotoskausilla paras selitysaste oli C18:1c9-rasvahapolla. Ensimmäisellä tuotoskaudella DIM:n ja C18:1c9-rasvahapon vaikutuksen sisältävän mallin selitysaste oli 0,45, toisella tuotoskaudella saman mallin selitysaste oli 0,60.

Taulukko 4. Ensimmäisen tuotoskauden plasman NEFA-pitoisuuden (mmol/L), tuotospäivän ja maidon rasvahappopitoisuuksien (mg/100 ml) tai rasva-
valkuaissuhteen lineaarinen regressio laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa, n=499.

	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasvahappo				
	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	r ²	AIC
C4:0	0,495	0,097	<0,0001	-0,015	0,003	<0,0001	1,831	0,533	0,0008	0,199	57,2
C6:0	0,932	0,106	<0,0001	-0,019	0,002	<0,0001	-1,410	1,079	0,1938	0,188	56,7
C8:0	1,069	0,098	<0,0001	-0,019	0,002	<0,0001	-5,180	1,647	0,002	0,255	25,1
C10:0	1,083	0,008	<0,0001	-0,018	0,002	<0,0001	-2,706	0,570	<0,0001	0,320	2,7
C12:0	1,096	0,007	<0,0001	-0,017	0,002	<0,0001	-2,517	0,461	<0,0001	0,343	-4,5
C14:0	1,169	0,104	<0,0001	-0,018	0,002	<0,0001	-0,835	0,207	<0,0001	0,294	22,6
C14:1	0,317	0,072	<0,0001	-0,017	0,002	<0,0001	-4,588	2,250	0,0434	0,180	53,8
C16:0	0,753	0,087	<0,0001	-0,018	0,002	<0,0001	0,043	0,056	0,4434	0,172	72,7
C16:1c	0,246	0,067	0,0003	-0,009	0,002	<0,0001	5,470	0,666	<0,0001	0,383	-26,9
C17:0	0,332	0,087	0,0002	-0,012	0,002	<0,0001	12,824	2,348	<0,0001	0,260	27,4
C18:0	0,306	0,077	0,0001	-0,012	0,002	<0,0001	0,706	0,110	<0,0001	0,313	16,2
C18:1c9	0,190	0,062	0,0028	-0,009	0,002	<0,0001	0,446	0,048	<0,0001	0,445	-50,9
C18:2	0,446	0,087	<0,0001	-0,016	0,002	<0,0001	2,881	0,639	<0,0001	0,251	48,6
C18:2c9c12	0,331	0,096	0,0007	-0,015	0,002	<0,0001	5,567	1,076	<0,0001	0,299	35,9
C18:3c9c12c15	0,629	0,072	<0,0001	-0,017	0,002	<0,0001	6,643	2,317	0,0048	0,205	59,9
C18:2c9t11	0,745	0,058	<0,0001	-0,017	0,002	<0,0001	2,420	1,569	0,1254	0,179	63,5
toC18:1c	0,188	0,063	0,0033	-0,009	0,002	<0,0001	0,419	0,045	<0,0001	0,445	-50,2
toC18:1t	0,704	0,007	<0,0001	-0,017	0,002	<0,0001	0,680	0,371	0,0694	0,185	66,2
	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasva-valkuaissuhde				
Rasva- valkuaissuhde	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	r ²	AIC
	0,360	0,085	<0,0001	-0,019	0,002	<0,0001	0,386	0,067	<0,0001	0,294	40,0
	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasvapitoisuus				
Rasvapitoisuus	-0,115	0,105	0,2763	-0,011	0,002	<0,0001	0,168	0,021	<0,0001	0,378	-6,9

Taulukko 5. Toisen tuotoskauden plasman NEFA-pitoisuuden (mmol/L), tuotospäivän ja maidon rasvahappopitoisuuksien (mg/100 ml) tai rasva-alkuaissuhteen lineaarinen regressio laktatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa, n=161.

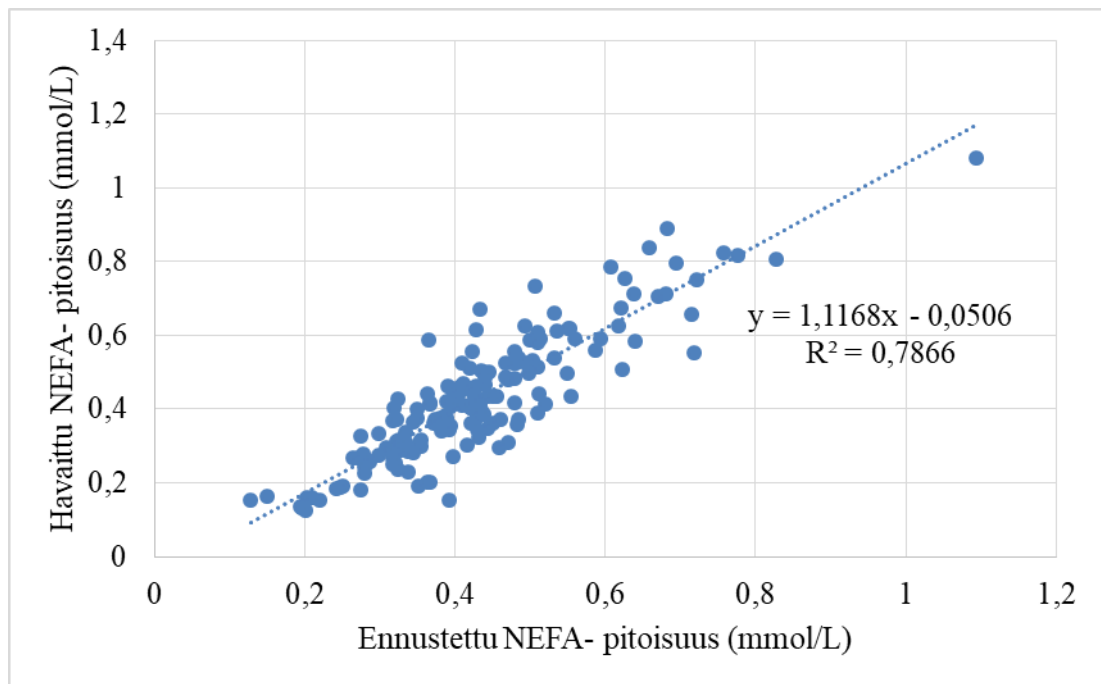
	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasvahappo			r ²	AIC
	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t		
C4:0	0,208	0,116	0,0806	-0,005	0,002	0,0401	2,112	0,715	0,0051	0,253	-160,8
C6:0	0,564	0,122	<0,0001	-0,008	0,002	0,0013	-0,197	1,372	0,8866	0,119	-152,6
C8:0	0,707	0,110	<0,0001	-0,009	0,002	0,0002	-2,788	1,940	0,1579	0,180	-152,0
C10:0	0,826	0,078	<0,0001	-0,010	0,002	<0,0001	-2,207	0,572	0,0004	0,309	-154,7
C12:0	0,852	0,071	<0,0001	-0,010	0,002	<0,0001	-2,117	0,435	<0,0001	0,371	-162,8
C14:0	0,829	0,099	<0,0001	-0,009	0,002	0,0001	-0,559	0,199	0,0075	0,262	-147,7
C14:1	0,722	0,064	<0,0001	-0,007	0,002	0,0042	-6,923	2,789	0,0042	0,224	-152,2
C16:0	0,591	0,107	<0,0001	-0,008	0,002	0,0006	-0,024	0,077	0,7511	0,118	-142,1
C16:1c	0,201	0,083	0,0199	-0,005	0,002	0,0368	4,592	1,021	<0,0001	0,407	-176,1
C17:0	0,178	0,117	0,1368	-0,005	0,002	0,0539	11,71	3,606	0,0023	0,278	-162,9
C18:0	0,062	0,099	0,537	-0,004	0,002	0,0678	0,763	0,151	<0,0001	0,461	-178,6
C18:1c9	0,105	0,070	0,1382	-0,005	0,002	0,0179	0,445	0,066	<0,0001	0,604	-203,3
C18:2	0,111	0,106	0,299	-0,007	0,002	0,0021	4,140	0,936	<0,0001	0,355	-169,2
C18:2c9c12	0,086	0,095	0,3703	-0,008	0,002	0,0004	6,515	1,255	<0,0001	0,375	-176,0
C18:3c9c12c15	0,273	0,097	0,007	-0,006	0,002	0,0156	11,488	3,802	0,0042	0,256	-162,9
C18:2c9t11	0,460	0,059	<0,0001	-0,007	0,002	0,0046	4,214	2,070	0,0479	0,206	-148,4
toC18:1c	0,104	0,070	0,146	-0,005	0,002	0,0148	0,418	0,062	<0,0001	0,606	-203,5
toC18:1t	0,319	0,091	0,001	-0,006	0,002	0,0179	1,514	0,568	0,0108	0,263	-154,9
Rasva- alkuaissuhde	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasva-alkuaissuhde			r ²	AIC
	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t	Estimaatti	Hajonta	PR> t		
	0,265	0,075	0,001	-0,011	0,002	<0,0001	0,285	0,066	<0,0001	0,322	-161,3
Rasvapitoisuus	Leikkauspiste			Tuotospäivä			Rasvapitoisuus			r ²	AIC
	0,222	0,174	0,207	0,006	0,002	0,0099	0,064	0,035	0,0758		



Kuva 3. Ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden yhteys ensimmäisellä tuotoskaudella laktaatioviikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä olivat C18:1c9-rasvahapon pitoisuus ja tuotospäivä.

NEFA-pitoisuuden ennuste korreloi havaitun NEFA- pitoisuuden kanssa ensimmäisellä tuotoskaudella 0,84 (Kuva 3.) laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa ($r^2 = 0,70$), kun mallin selittävinä tekijöinä olivat C18:1c9-rasvahappo ja tuotospäivä, ja satunnaistekijöinä leikkauspiste ja rasvahappo. Samalla mallilla toisen tuotoskauden korrelaatio oli 0,89 (Kuva 4), selityssasteen ollessa 0,79.

C18:1c9-rasvahapon ja tuotospäivän ollessa selittävinä tekijöinä oli ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden välinen kulmakerroin ensimmäisellä tuotoskaudella 1,15, ja toisella tuotoskaudella 1,12 (Kuvat 3 ja 4). Ensimmäisessä laktaatiossa ennusteen virheen suuruus (RMSE) oli 0,16 mmol/L, josta kulmakerroinvirheen osuus oli 3,7 % ja satunnaisvirheen 96,3 %, vaihtelukertoimen (CV) ollessa 30,9 %. Toisessa laktaatiossa ennustemallin RMSE oli 0,08 mmol/L. Kulmakerroinvirheen osuus oli 3,9 % ja satunnaisvirheen 96,1 %. Vaihtelukerroin oli toisessa laktaatiossa 18,7 %.



Kuva 4. Ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden yhteys toisella tuotoskaudella laktaatioviikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä olivat C18:1c9-rasvahapon pitoisuus ja tuotospäivä.

6.3. Useamman kuin kahden selittäjän regressiomallit

Useamman kuin kahden selittäjän regressiomalleihin valittiin tuotospäivän lisäksi rasvahappoja ja tuotos- ja syöntiominaisuuksia, jotka korreloivat hyvin plasman NEFA-pitoisuuden kanssa (Liite 4), ja heikosti toistensa kanssa (Liite 5 ja 6). Mallien satunnaistekijöinä olivat leikkauspiste ja mallissa selittävänä tekijänä oleva pitkä rasvahappo. Useamman kuin kahden selittäjän ennustemallien selitysasteet olivat parempia kuin yhden rasvahapon ennustemallien molemmilla tuotoskausilla.

6.3.1 Ensimmäinen laktaatiokausi

Ensimmäisen laktaatiokauden kaikissa useamman kuin kahden selittäjän regressiomalleissa parhaat selitysasteet ja AIC:n arvot olivat malleissa, joissa oli selittävissä tekijöissä mukana C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuudet (Taulukko 6). Erot eri ryhmien kesken eivät olleet suuria laktaatiokauden sisällä. Kahta rasvahappoa ja tuotospäivää useamman selittävän tekijän lisääminen ei tuonut sanottavaa parannusta ennustemalleihin. Kolmen rasvahapon yhdistelmän (Ryhmä 2) parhaiden mallien selitysasteet olivat samaa tasoa kuin kahden rasvahapon yhdistelmissä (Ryhmä 1), mutta heikoimpien ryhmän 1 mallien AIC:n arvot paranivat, kun malliin otettiin C4:0-rasvahappo mukaan. Ryhmässä 3 rasva-valkuaissuhteen lisääminen mallin selittäjiin laski hieman mallien selitysastetta ja mallien AIC heikkeni

huomattavasti. Energiataseen lisääminen selittäjiin kahden rasvahapon lisäksi ryhmässä 4 lisäsi hieman mallin selitysstetta, mutta heikensi huomattavasti AIC-arvoa verrattuna ryhmiin 1 ja 2. Ryhmän 5 ennustemalleissa maidon valkuaispitoisuuden vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä muutamissa malleissa ja sen regressiokertoimen arvo vaihteli rajusti, ollen välillä 0,05 – 0,95. Kun ryhmän 5 mallista otettiin valkuaispitoisuus pois selittävistä tekijöistä (Ryhmä 6), oli mallien AIC-arvo pienin kaikista malleista ja selitysstaste korkein. Ryhmän 7 selitysstaste oli samalla tasolla ryhmien 1 ja 2 kanssa, mutta tämän mallin AIC-arvot olivat kaikista ryhmistä huonoimmat. Eri ennustemalliryhmien parhaiten NEFA-pitoisuutta kuvaavat regressioyhtälöt ensimmäiselle laktaatiokaudelle on esitetty taulukossa 8.

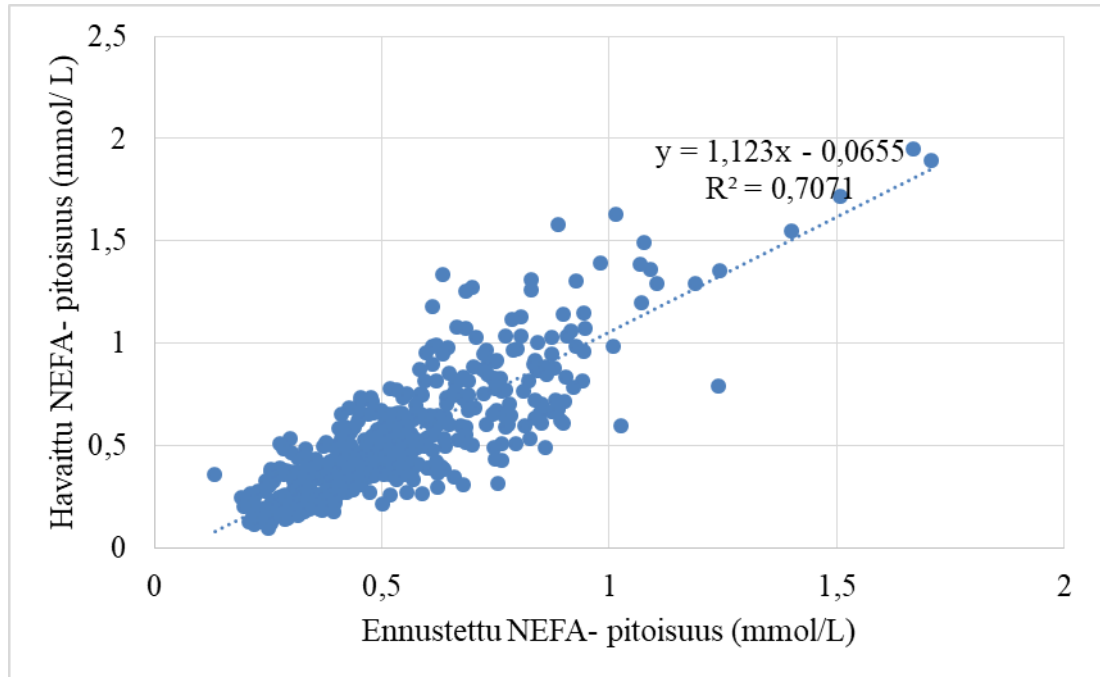
Taulukko 6. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selitysstasteet, AIC ja jäännösvirheet ensimmäisellä laktaatiokaudella laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa (n=499).

1. laktaatio, n= 499				
	Selittävät muuttujat DIM lisäksi	r ²	AIC	RMSE
Ryhmä 1.	C10:0 + C16:1	0,502	-65,2	0,165
	C10:0 + C18:1c9	0,518	-79,1	0,162
	C10:0 + C18:2c9c12	0,464	-35,4	0,171
	C12:0 + C16:1	0,512	-68,8	0,164
	C12:0 + C18:1c9	0,521	-80,7	0,162
	C12:0 + C18:2c9c12	0,475	-38,9	0,170
	C14:0 + C16:1	0,525	-72,9	0,164
	C14:0 + C18:1c9	0,537	-86,8	0,162
	C14:0 + C18:2c9c12	0,456	-29,9	0,172
Ryhmä 2.	C4:0 + C10:0 + C16:1	0,500	-67,4	0,165
	C4:0 + C10:0 + C18:1c9	0,523	-81,8	0,162
	C4:0 + C10:0 + C18:2c9c12	0,479	-44,4	0,170
	C4:0 + C12:0 + C16:1	0,510	-70,6	0,164
	C4:0 + C12:0 + C18:1c9	0,527	-83,4	0,162
	C4:0 + C12:0 + C18:2c9c12	0,483	-44,8	0,170
	C4:0 + C14:0 + C16:1	0,526	-79,4	0,164
	C4:0 + C14:0 + C18:1c9	0,536	-88,8	0,162
	C4:0 + C14:0 + C18:2c9c12	0,492	-51,1	0,171
Ryhmä 3.	C4:0 + C10:0 + C16:1 + FPR	0,523	-70,2	0,163
	C4:0 + C10:0 + C18:1c9 + FPR	0,529	-80,7	0,162
	C4:0 + C10:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,491	-43,6	0,169
	C4:0 + C12:0 + C16:1 + FPR	0,530	-72,6	0,162
	C4:0 + C12:0 + C18:1c9 + FPR	0,533	-82,0	0,162
	C4:0 + C12:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,492	-43,6	0,169
	C4:0 + C14:0 + C16:1 + FPR	0,549	-82,9	0,162
	C4:0 + C14:0 + C18:1c9 + FPR	0,543	-88,0	0,162
	C4:0 + C14:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,507	-52,3	0,169
Ryhmä 4.	C10:0 + C16:1 + EB	0,547	-78,2	0,162
	C10:0 + C18:1c9 + EB	0,555	-90,2	0,161
	C10:0 + C18:2c9c12 + EB	0,531	-47,8	0,166

	C12:0 + C16:1 + EB	0,556	-82,1	0,162
	C12:0 + C18:1c9 + EB	0,559	-92,7	0,161
	C12:0 + C18:2c9c12 + EB	0,539	-51,3	0,166
	C14:0 + C16:1 + EB	0,564	-84,3	0,161
	C14:0 + C18:1c9 + EB	0,572	-97,1	0,160
	C14:0 + C18:2c9c12 + EB	0,519	-43,1	0,168
Ryhmä 5.	C10:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,563	-91,5	0,159
	C10:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,566	-94,6	0,158
	C10:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,569	-72,3	0,160
	C12:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,565	-94,6	0,159
	C12:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,566	-96,5	0,158
	C12:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,565	-74,3	0,161
	C14:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,590	-110,0	0,158
	C14:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,583	-110,4	0,158
	C14:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,583	-85,4	0,160
Ryhmä 6.	C10:0 + C16:1 + Rasva	0,558	-92,0	0,160
	C10:0 + C18:1c9 + Rasva	0,564	-96,2	0,158
	C10:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,568	-76,0	0,160
	C12:0 + C16:1 + Rasva	0,563	-98,6	0,160
	C12:0 + C18:1c9 + Rasva	0,565	-99,1	0,158
	C12:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,565	-78,3	0,161
	C14:0 + C16:1 + Rasva	0,588	-111,6	0,158
	C14:0 + C18:1c9 + Rasva	0,583	-113,4	0,158
	C14:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,583	-89,5	0,160
Ryhmä 7.	C10:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,546	-68,2	0,164
	C10:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,549	-78,7	0,162
	C10:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,527	-34,7	0,167
	C12:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,555	-71,7	0,163
	C12:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,552	-80,8	0,162
	C12:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,534	-37,7	0,167
	C14:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,564	-74,6	0,163
	C14:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,565	-85,5	0,161
	C14:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,514	-29,8	0,169

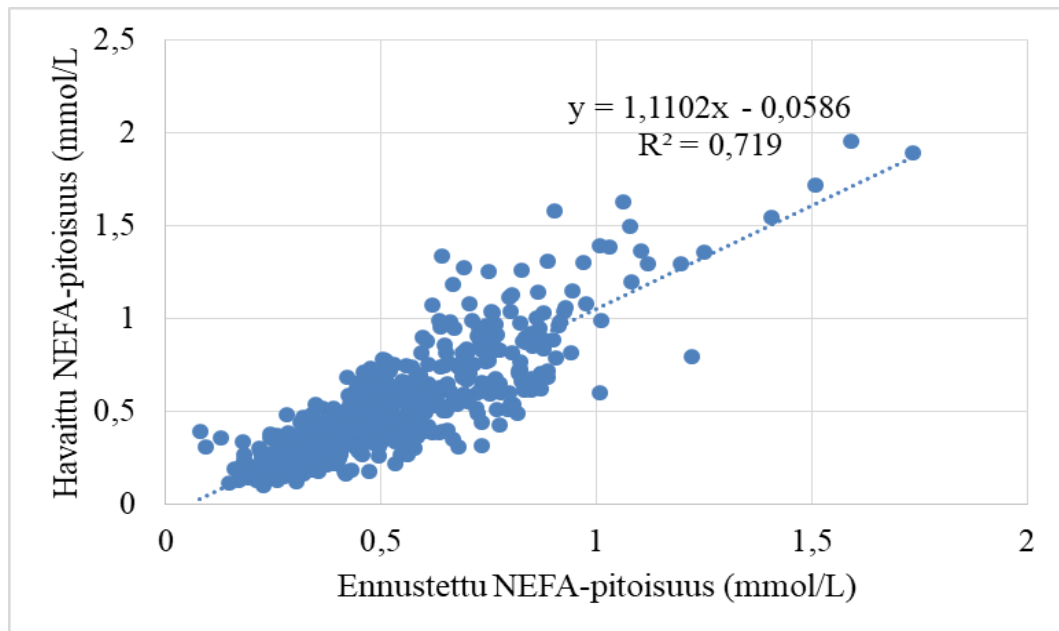
Satunnaistekijöinä leikkauspiste ja pitkä rasvahappo.

C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuuden ja tuotospäivän ollessa selittävinä tekijöinä (ryhmä 1) oli kulmakerroin havaitun ja ennustetun NEFA-pitoisuuden välillä 1,12 (Kuva 5). Tuotospäivän ja kahden rasvahapon mallissa C14:0 + C18:1c9 ensimmäisessä laktatioissa ennustemallin ennustevirhe oli 0,16 mmol/L. Kulmakerroinvirheen osuus virheestä oli 2,8 % ja satunnaisvirheen 97,2 %, vaihtelukertoimen ollessa 30,3 %.



Kuva 5. Ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden yhteys ensimmäisellä tuotoskaudella yhdistettynä laktatioviikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä olivat C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuudet sekä tuotospäivä.

Rasvapitoisuuden, C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuuden sekä tuotospäivän ollessa selittävinä tekijöinä (ryhmä 6) oli kulmakerroin ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden välillä 1,11 (Kuva 6). Tuotospäivän, rasvapitoisuuden ja kahden rasvahapon mallissa C14:0 + C18:1c9 ensimmäisessä laktaatiossa ennustemallin ennustevirhe oli 0,16 mmol/L. Kulmakerroinvirheen osuus virheestä oli 2,5 % ja satunnaisvirheen 97,5 %, vaihtelukertoimen ollessa 29,6 %.



Kuva 6. Ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden yhteys ensimmäisellä tuotосkaudella yhdistettynä laktaatioviikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä olivat maidon rasvapitoisuus, C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuudet sekä tuotospäivä.

Taulukko 8. Parhaiten NEFA-pitoisuutta kuvaavien useamman kuin kahden selittävän tekijän regressiomallit ensimmäisellä tuotokaudella laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa, satunnaistekijöinä leikkauspiste ja C18:1c9-pitoisuus.

Ryhmä 1.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C14:0		C18:1c9			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C14:0 + C18:1c9	0,506***	0,075	-0,009***	0,002	-0,805***	0,129	0,492***	0,045	0,537	-86,8

Ryhmä 2.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C4:0		C14:0		C18:1c9			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C4 + C14:0 + C18:1c9	0,495***	0,079	-0,009**	0,002	0,455	1,015	-0,879***	0,210	0,467***	0,071	0,536	-88,8

Ryhmä 4.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C14:0		C18:1c9		Energiatase			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C14:0 + C18:1c9 + EB	0,479***	0,062	-0,008***	0,002	-0,754***	0,116	0,418***	0,046	-0,002***	0,000	0,572	-97,1

Ryhmä 6.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C14:0		C18:1c9		Rasvapitoisuus			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C14:0 + C18:1c9 + Rasva	0,232**	0,087	-0,008**	0,002	-1,276***	0,148	0,263***	0,057	0,149***	0,025	0,583	-113,4

*** = P<0,0001

** = P<0,01

* = P<0,05

6.3.2 Toinen laktaatiokausi

Toisella tuotoskaudella kaikkien ryhmien mallien selitysasteet olivat kauttaaltaan noin 0,15 yksikköä korkeammat kuin ensimmäisellä tuotoskaudella. Ennustevirhe oli kaikissa toisen tuotoskauden yhdistelmämalleissa noin puolet pienempi verrattuna ensimmäiseen tuotoskauteen. Myös toisella tuotoskaudella erot selitysasteissa ja AIC-arvoissa eri ryhmien välillä olivat pieniä. Parhaat arvot löytyivät myös toisella laktaatiokaudella malleista, joissa olivat C14:0- ja C18:1c9-rasvahapot selittäjinä. Erona ensimmäiseen tuotoskauteen myös mallien, joissa olivat mukana C14:0- ja C18:2c9c12-rasvahapot, selitysasteet olivat korkeat ja AIC-arvot pienimmät ja samaa tasoa C14:0- ja C18:1c9-rasvahappoyhdistelmien kanssa (Taulukko 7). Ryhmässä 2 kaikkien yhdistelmien selitysasteet olivat hieman korkeammat ryhmässä 1. Rasva-alkuaissuhteen lisääminen yhdistelmään (Ryhmä 3) ei parantanut mallien selitystasetta tai AIC-arvoa verrattuna ryhmiin 1 ja 2. Toisin kuin ensimmäisellä tuotoskaudella, toisella tuotoskaudella energiataseen vaikutus ei ollut merkitsevä (Ryhmä 4) millään yhdistelmällä. Ryhmän 4 selitysasteet olivat malleista huonoimmat, ja AIC:n arvot olivat kokonaisuudessaan toiseksi huonoimmat kaikista tutkituista ryhmistä toisella laktaatiokaudella. Ryhmän 5 selitysasteet olivat samaa tasoa kuin ryhmissä 1 ja 2, mutta AIC oli huonompi. Valkuaispitoisuuden poistaminen mallin selittävistä tekijöistä (Ryhmä 6) ei juuri muuttanut mallin selitystasetta tai AIC-arvoa. Ryhmän 7 selitysasteet olivat vaihtelevia, ollen joko samaa tasoa ryhmien 1 ja 2 kanssa, tai heikompia. Ryhmän 7 AIC-arvot olivat heikoimpia kaikista ryhmistä, eikä sekä syönte- että tuotosominaisuuksien *P*-arvot olleet kuin yhdessä yhdistelmässä <0,05. Eri ennustemalliryhmien parhaiten NEFA-pitoisuutta kuvaavat regressioyhtälöt toiselle laktaatiokaudelle on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 7. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selitysasteet, AIC ja jäännösvirheet toisella laktaatiokaudella laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa (n=160).

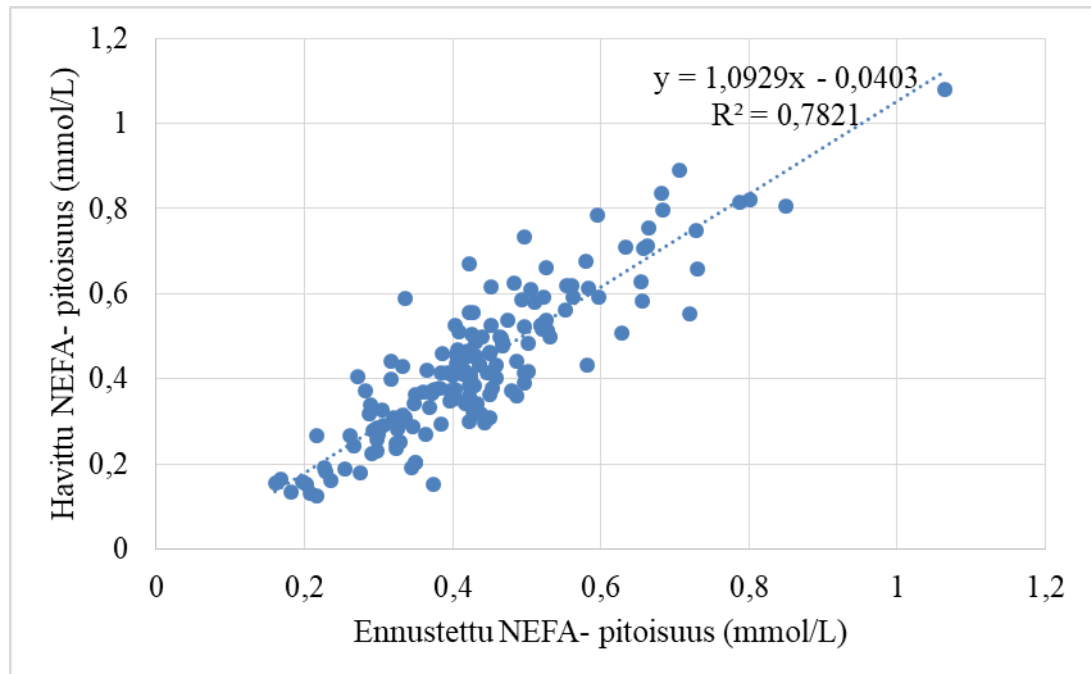
2. laktaatio, n=160				
	Selittävät muuttujat DIM lisäksi	r ²	AIC	RMSE
Ryhmä 1.	C10:0 + C16:1	0,609	-201,5	0,082
	C10:0 + C18:1c9	0,671	-218,4	0,082
	C10:0 + C18:2c9c12	0,642	-217,5	0,088
	C12:0 + C16:1	0,636	-206,1	0,081
	C12:0 + C18:1c9	0,682	-220,4	0,082
	C12:0 + C18:2c9c12	0,664	-222,6	0,087
	C14:0 + C16:1	0,632	-202,9	0,082
	C14:0 + C18:1c9	0,685	-220,5	0,083

	C14:0 + C18:2c9c12	0,641	-215,5	0,089
Ryhmä 2.	C4:0 + C10:0 + C16:1	0,643	-212,7	0,082
	C4:0 + C10:0 + C18:1c9	0,677	-221,4	0,081
	C4:0 + C10:0 + C18:2c9c12	0,676	-230,5	0,085
	C4:0 + C12:0 + C16:1	0,657	-214,9	0,082
	C4:0 + C12:0 + C18:1c9	0,687	-223,1	0,081
	C4:0 + C12:0 + C18:2c9c12	0,686	-232,1	0,085
	C4:0 + C14:0 + C16:1	0,671	-217,0	0,082
	C4:0 + C14:0 + C18:1c9	0,698	-225,4	0,081
	C4:0 + C14:0 + C18:2c9c12	0,698	-237,3	0,085
Ryhmä 3.	C4:0 + C10:0 + C16:1 + FPR	0,660	-215,1	0,083
	C4:0 + C10:0 + C18:1c9 + FPR	0,678	-219,1	0,082
	C4:0 + C10:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,676	-228,3	0,085
	C4:0 + C12:0 + C16:1 + FPR	0,671	-216,6	0,083
	C4:0 + C12:0 + C18:1c9 + FPR	0,689	-220,9	0,081
	C4:0 + C12:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,685	-229,9	0,085
	C4:0 + C14:0 + C16:1 + FPR	0,692	-221,2	0,084
	C4:0 + C14:0 + C18:1c9 + FPR	0,705	-224,4	0,081
	C4:0 + C14:0 + C18:2c9c12 + FPR	0,702	-235,4	0,086
Ryhmä 4.	C10:0 + C16:1 + EB	0,605	-187,3	0,082
	C10:0 + C18:1c9 + EB	0,664	-201,8	0,082
	C10:0 + C18:2c9c12 + EB	0,631	-202,8	0,087
	C12:0 + C16:1 + EB	0,632	-191,6	0,081
	C12:0 + C18:1c9 + EB	0,675	-203,8	0,082
	C12:0 + C18:2c9c12 + EB	0,654	-207,5	0,086
	C14:0 + C16:1 + EB	0,628	-188,4	0,082
	C14:0 + C18:1c9 + EB	0,678	-203,6	0,083
	C14:0 + C18:2c9c12 + EB	0,630	-200,4	0,088
Ryhmä 5.	C10:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,658	-203,6	0,083
	C10:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,683	-212,6	0,083
	C10:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,640	-206,2	0,088
	C12:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,672	-206,3	0,082
	C12:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,693	-214,2	0,082
	C12:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,641	-217,5	0,092
	C14:0 + C16:1 + Rasva + Valk.	0,686	-206,2	0,082
	C14:0 + C18:1c9 + Rasva + Valk.	0,698	-215,2	0,083
	C14:0 + C18:2c9c12 + Rasva + Valk.	0,604	-214,9	0,099
Ryhmä 6.	C10:0 + C16:1 + Rasva	0,639	-201,3	0,080
	C10:0 + C18:1c9 + Rasva	0,668	-213,1	0,082
	C10:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,628	-216,2	0,090
	C12:0 + C16:1 + Rasva	0,657	-205,3	0,080
	C12:0 + C18:1c9 + Rasva	0,680	-215,2	0,081
	C12:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,674	-215,4	0,084
	C14:0 + C16:1 + Rasva	0,673	-204,8	0,080
	C14:0 + C18:1c9 + Rasva	0,688	-216,5	0,082
	C14:0 + C18:2c9c12 + Rasva	0,631	-217,0	0,092
Ryhmä 7.	C10:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,618	-182,3	0,087
	C10:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,674	-197,8	0,086
	C10:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,637	-199,5	0,092
	C12:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,641	-186,5	0,086
	C12:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,683	-199,6	0,085
	C12:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,658	-203,9	0,090

C14:0 + C16:1 + ECM + MEI	0,636	-183,4	0,087
C14:0 + C18:1c9 + ECM + MEI	0,683	-199,5	0,086
C14:0 + C18:2c9c12 + ECM + MEI	0,629	-196,8	0,094

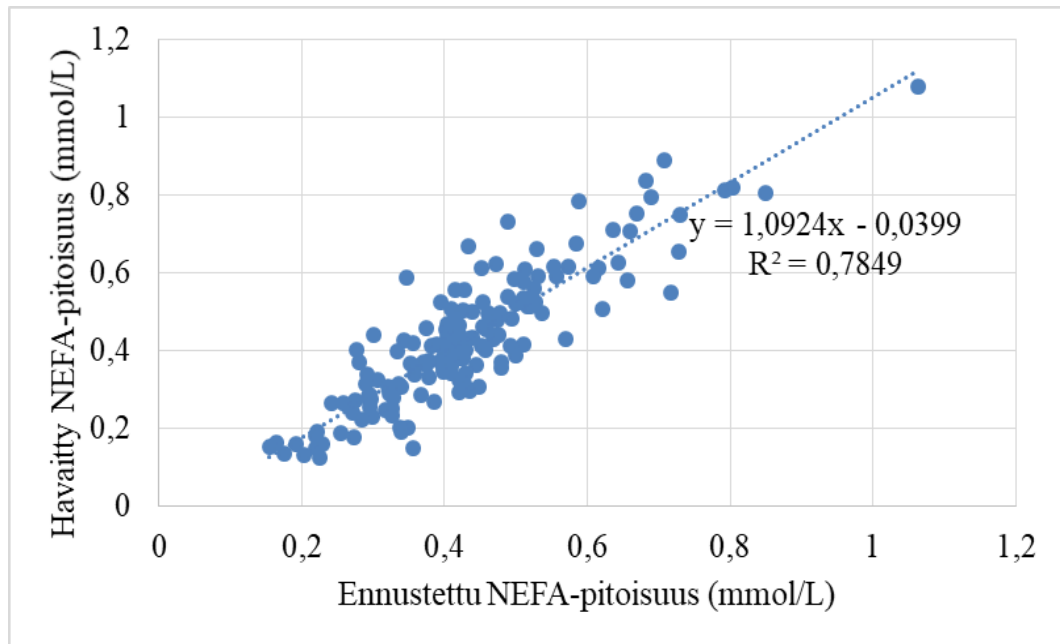
Satunnaistekijöinä leikkauspiste ja pitkä rasvahappo.

Maidon C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuuksien ja tuotospäivän ollessa selittävinä tekijöinä oli kulmakerroin ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden välillä toisella tuotoskaudella 1,09 (Kuva 7). Tuotospäivän ja kahden rasvahapon mallissa C14:0 + C18:1c9 toisessa laktatiossa ennustevirhe oli 0,08 mmol/L. Kulmakerroinvirheen osuus virheestä oli 2,5 % ja satunnaisvirheen osuus 97,5 %, vaihtelukertoimen ollessa 17,6 %.



Kuva 7. Ennustetun ja havaitun NEFA- pitoisuuden yhteys toisella tuotoskaudella yhdistettynä laktatioviiikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä ovat C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuudet sekä tuotospäivä.

Maidon rasvapitoisuuden, C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuuden sekä tuotospäivän ollessa selittävinä tekijöinä (ryhmä 6) oli kulmakerroin ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden välillä 1,09 (Kuva 8). Tuotospäivän, rasvapitoisuuden ja kahden rasvahapon mallissa C14:0 + C18:1c9 toisessa laktaatiossa ennustemallin ennustevirhe oli 0,08 mmol/L. Kulmakerroinvirheen osuus virheestä oli 1,9 % ja satunnaisvirheen 98,1 %, vaihtelukertoimen ollessa 17,4 %.



Kuva 8. Ennustetun ja havaitun NEFA-pitoisuuden yhteys toisella tuotoskaudella yhdistettynä laktaatioviikoilla 2 ja 3, kun ennustemallin selittävinä tekijöinä olivat maidon rasvapitoisuus, C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuudet sekä tuotospäivä.

Taulukko 9. Parhaiten NEFA-pitoisuutta kuvaavien useamman kuin kahden selittävän tekijän regressiomallit ensimmäisellä tuotoskaudella laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetyssä aineistossa, satunnaistekijöinä leikkauspiste ja C18:1c9-pitoisuus.

Ryhmä 1.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C14:0		C18:1c9			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C14:0 + C18:1c9	0,394***	0,914	-0,005**	0,002	-0,619***	0,131	0,450***	0,061	0,685	-220,5

Ryhmä 2.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C4:0		C14:0		C18:1c9			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C4 + C14:0 + C18:1c9	0,352**	0,094	-0,004	0,002	1,816	1,026	-0,898***	0,205	0,336**	0,089	0,698	-225,4

Ryhmä 6.	Leikkauspiste		Tuotospäivä		C14:0		C18:1c9		Rasvapitoisuus			
Selittävät tekijät, DIM +	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	Estimaatti	Hajonta	r ²	AIC
C14:0 + C18:1c9 + Rasva	0,294*	0,120	-0,005*	0,002	-0,777***	0,165	0,385**	0,074	0,048	0,033	0,688	-216,5

*** = P<0,0001

** = P<0,01

* = P<0,05

7. TULOSTEN TARKASTELU

Tutkielman tavoitteena oli tutkia maidon rasvahappoprofiilin ja yksittäisten rasvahappojen yhteyttä lehmän veren NEFA-pitoisuuteen. Hypoteesina oli, että maidon rasvahappoprofiilin ja rasvahappojen pitoisuuden perusteella voisi ennustaa plasman NEFA-pitoisuuden, ja sitä kautta lypsylehmien negatiivisen energiataseen.

Ruokinta ja karjan tuotosominaisuudet olivat Suomessa normaalilla korkeatuottoisen lypsykarjan tasolla (Taulukko 3.). Suomessa ayrshire-lehmien keskituotos oli vuonna 2015 noin 9130 kg EKM, eli noin 30 EKM kg/ pv. Ensikoilla maitotuotos oli vuodessa yli 1000 EKM (noin 4 EKM kg/pv) pienempi kuin toista kertaa poikivilla (Nokka 2015). Tässä aineistossa ensikoiden ja toisen kerran poikineiden tuotosero oli viikoilla 2 ja 3 huomattavasti tätä suurempi, koska ensikoiden ja vanhempien lehmien tuotosero on suurin laktaation alkuvaiheessa.

7.1. Maidon rasvahappoprofiilin fysiologinen tausta

Negatiivisessa energiataseessa plasman NEFA-pitoisuus nousee, kun lehmä käyttää kehon rasvakudoksia energian lähteenä. Rasvakudoksista vapautuneet rasvahapot ovat pääasiassa C16:0-, C18:0- ja C18:1c9-rasvahappoja. Koska näiden rasvahappojen otto maitorauhaseen on suoraan yhteydessä niiden pitoisuuteen plasmassa, on todennäköistä, että negatiivisen energiataseen voi ennustaa maidon rasvahappokoostumuksesta (Chilliard ym. 2000, Jorjong ym. 2014, McParland ym. 2014). Tässä tutkimuksessa C18:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuus maidossa kasvoi selvästi laktaatioviikoilla 2 ja 3 molemmilla tuotoskausilla (Kuvat 1 ja 2) laktaatioviikkoon 20 verrattuna. Maidon C16:0-pitoisuus ei kasvanut, mikä johtunee de novo -synteesin vähenemisestä. Kehon kudosten käytön lisäksi myös ruokinta muuttaa maidon rasvapitoisuutta ja rasvahappokoostumusta, joten se on huomioitava ennustettaessa energiatasetta maidon rasvahappokoostumuksesta ja sen muutoksista. Maitorauhasen pitkäketjuisten rasvahappojen saantiin voidaan vaikuttaa lisäämällä rehuannoksen rasvapitoisuutta, mikä muuttaa lähtöaineiden saantia ja rasvahappojen biohydrogenaatiota pötsissä, sekä vähentää de novo -synteesiä ja rasvahappojen desaturaatiota maitorauhasessa (McDonald ym. 2011).

Tässä tutkimuksessa käytettiin nurmisäilörehuun pohjautuvaa ruokintaa ilman rasvalisiä. Laidunkauden aikana kokeessa olleet lehmät olivat sisäruokinnassa, joten tuoreen

nurmen aiheuttamia muutoksia ei ollut maitonäytteissä. Mahdolliset ruokinnan aiheuttamat rasvahappomuutokset pyrittiin minimoimaan. Vertailuaineiston maitonäytteet kerättiin sekä sisäruokinta- että laidunkaudelta, eri roduista, karjoista, tuotantomalleista, eri tuotoskausilta ja –vaiheilta. Molemmilla tutkituilla laktaatiokausilla oli selvästi havaittavissa lehmien negatiivinen energiatase alkulaktaation aikana sekä laskennallisesti (rehun saanti – maitotuotos ja ylläpito), että plasman NEFA-pitoisuuksia tarkastelemalla.

7.2. Maidon yksittäisten rasvahappojen pitoisuuden yhteys plasman NEFA-pitoisuuteen

Tässä tutkimuksessa yksittäisistä rasvahapoista parhaiten lypsylehmien plasman NEFA-pitoisuuden kanssa korreloi maidon C18:1c9-pitoisuus molemmilla tuotoskausilla. Sama on havaittu myös muissa tutkimuksissa (Gross ym. 2011, Jorjong ym. 2014). Tutkimuksessamme maidon C16:1c-rasvahapon korrelaatio oli ensimmäisen tuotoskauden alussa miltei yhtä hyvä kuin öljyhapon, mutta C16:1c-rasvahapon pitoisuudet maidossa olivat vain kymmenesosan öljyhappopitoisuuksista, mikä saattaa heikentää mittaustuloksia MIR-tekniikalla, koska infrapunaspektrin tarkkuus ja infrapuna-analyysin teho ja luotettavuus ovat suurina pitoisuuksina esiintyville rasvahapoille paremmat kuin pienemmille pitoisuuksille (Soyert ym. 2006, DeMarchi ym. 2014). C18:0-rasvahapon pitoisuudet maidossa taas olivat suuremmat kuin C16:1c-rasvahapon pitoisuudet, ja noin puolet C18:1c9-pitoisuuksista, mutta korrelaatiot NEFA-pitoisuuden kanssa olivat huomattavasti alhaisemmat kuin edellä mainituilla. Muita pitkäketjuisia rasvahappoja esiintyy maidossa vain vähäisiä määriä tai niiden pitoisuuden suuri vaihtelu vähentää niiden käyttökelpoisuutta NEFA-pitoisuutta ennustettaessa (Gross ym. 2011).

Negatiivisessa energiataseessa lisääntynyt pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuus estää maitorauhasen de novo -synteesiä, mikä vähentää maidon keskipitkien (C10:0 – C16:0) rasvahappojen pitoisuutta. Näiden keskipitkien rasvahappojen korrelaatio NEFA-pitoisuuteen on siis negatiivinen. Tämä oli havaittavissa omassa tutkimuksessamme etenkin toisella laktaatiokaudella (Liite 4). Tässä tutkimuksessa keskipitkistä rasvahapoista vahvimmin negatiivisessa korrelaatioissa NEFA-pitoisuuden kanssa oli molemmilla tuotoskausilla C12:0-rasvahappo. Määrällisesti suurin keskipitkistä rasvahapoista oli C14:0, jonka pitoisuus maidossa oli yli kolminkertainen verrattuna C12:0-rasvahappoon kaikilla mitatuilla laktaatioviiikoilla (Liite 2 ja 3). Lyhytketjuisten

rasvahappojen pitoisuus pysyi melko muuttumattomana energiataseesta riippumatta. Tulokset ovat samassa linjassa kuin Chilliardin ym. (2000) tutkimuksessa, jossa lypsylehmän kehon rasvavarastojen käyttö nosti maidon rasvan C18:0- ja C18:1-rasvahappojen pitoisuutta C10:0 - C16:0-rasvahappojen kustannuksella ilman merkitsevää laskua C4:0 - C8:0-rasvahapoissa. Useissa muissa tutkimuksissa on havaittu sama ilmiö (Van Kneysel ym. 2005, Stoop ym. 2009, Gross ym. 2011, Jorjong ym. 2014).

Jorjongin ym. (2014) tutkimuksessa pyrittiin löytämään maidon rasvahappopitoisuuksista hälytysraja, joka toimisi haitallisen suurten NEFA-pitoisuuksien indikaattorina. Tutkimuksen mukaan 64,3 % lehmistä, joiden NEFA-pitoisuus oli haitallisella tasolla (0,6 mmol/L tai yli), tuotti maitorasvaan öljyhappoa 24 g/100 g maitorasvan rasvahappoja tai enemmän 84,4 % tarkkuudella. Jorjongin ym. (2014) mukaan vastaavissa oloissa pidettävien lehmien maidon öljyhappopitoisuuden taso vähintään 23 g/100 g maidon rasvahappoja voisi toimia hälytysrajana vakavasta negatiivisesta energiataseesta. Tässä tutkimuksessa määritettyjen ennusteyhtälöiden perusteella olisi haitallisen negatiivisen energiataseen hälytysrajana (NEFA-pitoisuus 0,6 mmol/L tai yli) C18:1c9-pitoisuus 1,2 mg/100 ml maitoa ensimmäisellä laktaatiokaudella ja 1,25 mg/100 ml maitoa toisella laktaatiokaudella.

Jorjongin ym. (2014) tutkimuksessa havaittiin veren NEFA-pitoisuuden ja maidon C18:1c9-pitoisuuden välisen positiivisen korrelaation olevan kohtalainen (0,62) laktaatioviikoilta 2, 3, 4, ja 8 mitattuna. Näin ollen tarkka plasman NEFA-pitoisuuden ennustaminen suoraan maitorasvan öljyhappopitoisuudesta on epäluotettavaa Jorjongin ym. (2014) mukaan. Tässä tutkimuksessa maidon C18:1c9-pitoisuuden (mg/100 ml maitoa) ja tuotospäivän perusteella ennustettu NEFA-pitoisuus korreloi vahvasti havaitun NEFA-pitoisuuden kanssa ensimmäisellä laktaatiokaudella 0,70 ja toisella laktaatiokaudella 0,79 (Kuvat 3 ja 4). Oman haasteensa eri tutkimusten tulosten vertailuun tuo rasvahappojen pitoisuuden ilmoittaminen grammoina tai milligrammoina maidossa, rasvassa tai rasvahapon metyyliestereissä, sekä erot menetelmissä, jolla rasvahappopitoisuus on määritetty (MIR vs. kaasukromatografia, erot laitteiden ja kalibrointiyhtälöiden välillä). Tässä tutkimuksessa maidon rasvahappopitoisuudet olivat MIR-spektristä ennustettuja, ja näiden ennusteiden perusteella ennustettiin plasman NEFA-pitoisuutta. Tämä osaltaan voi lisätä tässä tutkimuksessa olleiden ennustemallien satunnaisvirhettä.

7.3. Tuotosvaiheen vaikutus maidon rasvahappoprofiiliin, energiataseeseen ja plasman NEFA-pitoisuuteen

Grossin ym. (2011) tutkimuksessa suurimmat muutokset maidon rasvahappoprofiilissa ajoittuivat ensimmäiseltä poikimisen jälkeiseltä viikolta viikolle kuusi poikimisen jälkeen, kun lehmät olivat negatiivisessa energiataseessa, kun taas viikolta 12 viikolle 21 poikimisen jälkeen rasvahappoprofiili oli melko muuttumaton. Grossin ym. (2011) mukaan laktaatiovaihe ei vaikuta pitkäketjuisten rasvahappojen ja de novo –synteesissä syntyvien rasvahappojen pitoisuuteen, kun ruokinta pysyy vakiona, vaan muutokset näissä rasvahapoissa heijastavat muutoksia lehmän energiataseessa. Jorjongin ym. (2014) tutkimuksessa haitallisen negatiivisen energiataseen riskin todettiin olevan kahden kuukauden sisällä poikimisesta. Friggensin ym. (2007) mukaan suurimmat muutokset energiataseessa ja vakavin negatiivinen energiatase ovat yleensä useita kertoja poikineilla lehmillä.

Tässä tutkimuksessa vakavin negatiivinen energiatase (MJ ME/pv) oli toisella tuotosviikolla, josta se parani vähitellen ja oli viikolle 20 mennessä keskimäärin kääntynyt positiiviseksi. Toisen tuotoskauden laktaatioviikkojen 2 ja 3 energiatase oli selkeästi negatiivisempi kuin ensimmäisellä tuotoskaudella huolimatta suuremmasta rehun syönnistä. Tämä oletettavasti johtui pääosin lehmien suuremmasta maitotuotoksesta toisella tuotoskaudella. Vakavampi negatiivinen energiatase ei kuitenkaan näkynyt plasman NEFA-pitoisuuksissa, jotka olivat toisen tuotoskauden alkuvaiheessa alhaisemmat kuin ensimmäisen tuotoskauden alussa. Tämä voisi johtua ensikoiden mahdollisesti suuremmasta stressistä verrattuna toista kertaa poikiviin, sillä stressi lisää plasman NEFA-pitoisuutta (Leroy ym. 2011, McDonald ym. 2011). Toista kertaa poikineet lehmät olivat todennäköisesti tottuneet lypsyyntä, verinäytteiden ottoon, ihmisen käsittelyyn ja navetan olosuhteisiin, kun taas ensikoille maitotuotoksen aloittaminen ja sen mukanaan tuomien käsittelyjen, kuten lypsyrobotille tai –asemalle kulkemisen opettelu, saattoi aiheuttaa stressiä (Weiss ym. 2004). Verinäytteet otettiin lehmistä heti lypsyn jälkeen, joten jos lypsy tai lehmän ohjaaminen verinäytteen ottoon aiheutti eläimelle stressiä, se saattoi nostaa veren NEFA-pitoisuutta (Brickner ym. 2007). Tuotoskauden alkuun liittyi myös lehmien siirtoja ryhmästä ja paikasta toiseen. Siirrot olivat todennäköisesti stressaavampia ensikoille, koska ne ovat usein alempana

hierarkiassa. Yksilöiden kokeman stressiin ja uusiin tilanteisiin tottumiseen vaikutti myös lehmän luonne (Hopster ym. 1999, Brickner ym. 2007).

Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksessa havaittiin, että lehmän ollessa positiivisessa tai vain hieman negatiivisessa energiataseessa laktation alussa, ei plasman NEFA-pitoisuus nouse, joten tuotosviikko itsessään ei näyttäisi vaikuttavan NEFA-pitoisuuteen. Grossin ym. (2011) tutkimuksessa plasman NEFA-pitoisuudet olivat korkeimmillaan toisella tuotosviikolla ($0,9 \text{ mmol/L} \pm 0,06$). Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksessa ilmoitettiin tuotosviikoilta 2, 3 ja 5 lehmien NEFA-pitoisuuden keskiarvo, joka oli $0,25 \pm 0,12 \text{ mmol/L}$. Tutkimuksen pientä NEFA-pitoisuutta selitettiin sillä, että kokeessa käytettiin ensikoita, joilla pienemmän maitotuotoksen takia on hillitympi ja lyhytkestoisempi energiavaje kuin useamman kerran poikineilla. Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksessa lehmien energiatase oli jo kuudennella tuotosviikolla kääntynyt positiiviseksi. Vaikka Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksessa plasman NEFA-pitoisuudet olivat alhaiset, havaittiin NEFA-pitoisuuden ja energiataseen välillä merkitsevä korrelaatio (0,85). Tutkimuksessamme havaittiin huomattavasti suurempia NEFA-pitoisuuksia ensikoilta kuin Mäntysaaren ja Mäntysaaren (2010) ja Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksissa käytetyssä Rehti-aineistossa. Keskimäärin vähemmän negatiivinen energiatase Mäntysaaren ym. (2012) tutkimuksessa selittää NEFA-pitoisuuden eroa tutkimukseemme verrattuna. Omassa tutkimuksessamme ensikoiden energiatase oli toisella laktatioviikolla keskimäärin -37 ME MJ päivässä, kun Rehti-aineiston vastaava luku oli -26 ME MJ päivässä. Valitettavasti Rehti-aineistoa kerätessä ei tutkittu maidon rasvahappopitoisuuksia. Sekä Rehti-aineistoon perustuvissa tutkimuksissa, että omassamme, havaittiin ensikoilla tuotoskauden alussa NEFA-pitoisuuksien suuri hajonta sekä eläinten välillä että saman eläimen eri näytteiden välillä.

7.4. Vaihtoehtoiset energiataseen ennustemallit

Muutokset lehmien kehonkoostumuksessa ja elopainossa heijastavat energiatasetta pitkällä aikavälillä, mutta ne eivät sovellu lyhyen aikavälin mittauksiin eivätkä anna reaaliaikaista tietoa energiataseesta (Clark ym. 2005, Friggens ym. 2007). Verikokeista tehtävät määritykset, maidon kaasukromatografinen koostumusmittaus ja energiataseen laskemiseen tarvittavien tietojen mittaaminen ovat kalliita ja hankalia toteuttaa rutiininomaisesti tilatasolla, joten MIR-mittaus olisi tällä hetkellä kustannustehokkain

vaihtoehto energiataseen ennustamiseen (Soyert ym. 2006). Aikaisemmissa tutkimuksissa rasva-valkuaissuhde (FPR) on selittänyt energiatasetta kohtalaisesti (Heuer ym. 2000, Friggens ym. 2007, Buttchereit ym. 2011). Tässä tutkimuksessa maidon FPR ei ollut yhtä hyvä selittäjä NEFA-pitoisuudelle kuin joidenkin rasvahappojen pitoisuus (Taulukot 4 ja 5). Sekä Heuerin ym. (2000) että Friggensin ym. (2007) tutkimuksissa todettiin, että FPR:n tarkkuus ennustaa negatiivista energiatasetta ei ole yhtä hyvä kuin esimerkiksi rehun syönnin ja elopainon mittauksista muodostettujen ennusteiden. Clarkin ym. (2005) mukaan maidon rasva- ja valkuaispitoisuus sekä FPR korreloivat vain vähän energiataseen kanssa. Tässä tutkimuksessa FPR:n korrelaatio plasman NEFA-pitoisuuden kanssa vaihteli tuotoskausien välillä (Liite 4). Ensimmäisellä tuotoskaudella korrelaatio oli pienimmillään toisella tuotosviikolla, josta se nousi ollen ylimmillään laktaatioviikolla 20. Toisella tuotoskaudella korrelaatio taas oli ylin toisella tuotosviikolla ja alimmillaan laktaatioviikolla 20. Useamman kuin kahden selittäjän regressiomalleissa ei FPR ollut merkitsevä selittäjä yhdessäkään mallissa, missä maidon C18:1c9-rasvahapon pitoisuus oli mukana selittävänä tekijänä. Jos ennustemallin selittävinä tekijöinä oli tuotospäivä ja FPR, jäi selitysaste ja AIC huomattavasti heikommaksi kuin parhaissa kahden rasvahapon malleissa. Kummallakaan tuotoskaudella FPR:n lisääminen malliin ei tuonut parannusta mallin selitysasteeseen tai AIC-arvoon. Mäntysaaren ja Mäntysaaren (2010) tutkimuksessa käytetyssä Rehti-aineistossa FPR oli korkeimmillaan tuotosviikolla 4 (1,28). Omassa tutkimuksessamme ensikoiden FPR nousi hieman toiselta tuotosviikolta kolmannelle ja oli laktaatioviikolla 20 laskenut takaisin laktaatioviikon 2 tasolle. Luultavasti FPR heijastaa negatiivista energiatasetta, mutta sen kautta energiataseen ennustamiseen tarvitaan useita näytteitä pidemmältä aikaväliltä alkulaktaatiossa.

Maidon asetonipitoisuus korreloi Clarkin ym. (2005) mukaan negatiivisen energiataseen kanssa. Myös McParlandin ym. (2014) mukaan ketoosi kasvattaa asetonin ja BHBA-pitoisuutta lehmän veressä ja maidossa, mikä voidaan ennustaa MIR-spektristä. Maidon asetonipitoisuus on kuitenkin herkkä rehun vaikutukselle (säilörehun voi happo), vaihtelee lehmien välillä paljon ja on herkkä paastolle. Tarvitaan lukuisia näytteitä, että saadaan selville yksilön normaalitaso, ja silti tulokset ovat epäluotettavia. Clarkin ym. (2005) tutkimuksessa laidunruokinnalla olevilla lehmillä maidon asetonikonsentraatio selitti 41 % energiataseen vaihtelusta alkulaktaatiossa. Maidon asetonipitoisuus korreloi negatiivisesti energiataseen kanssa (-0,64) ja maidon asetonipitoisuus korreloi hyvin veren asetonipitoisuuden kanssa tasaisesti koko laktaation ajan. Omassa

tutkimuksessamme ei mitattu maidon asetonipitoisuuksia, mutta se saattaa olla mahdollinen mittari energiataseelle laidunruokinnalla oleville lehmille, jos maidon rasvahappokoostumus vaihtelee paljon laitumen takia.

7.5. Ennustemallien vertailu

Energiataseen ja NEFA-pitoisuuden ennustamiseksi tehtyjen tutkimusten välinen vertailu vaikeaa, koska tutkimuksissa on käytetty eri määriä näytteitä eri määrittämenetelmillä ja tehty erilaisia esikäsittelyjä MIR-spektreille. Rasvahappojen ja rasvahapporyhmien pitoisuuksia ilmaistaan eri yksiköissä (esim. g/100 ml maitoa, mg/g maitorasvaa, g rasvahappoja/100 g rasvahapon metyyliestereitä), joten niiden suora vertaaminen toisiinsa ei ole mahdollista (DeMarchi ym. 2014). DeMarchin ym. (2014) mukaan maidon rasvahappokoostumuksen ennustaminen MIR-analyysin tuloksista on tarkempaa, kun rasvahappojen pitoisuus ilmaistaan maidon tilavuusyksikköä kohti. Jos lehmä on negatiivisessa energiataseessa tai ruokinta laskee voimakkaasti maitorasvan pitoisuutta koko laktaatiokauden ajan, voidaan sen maidon rasvahappokoostumus virheellisesti määritellä normaaliksi. Tämä voi kaventaa eroja negatiivisessa ja normaalissa energiataseessa olevien lehmien välillä, jolloin energiataseen vaikutuksen arviointi maidon rasvahappokoostumuksen perusteella vääristyy (Stoop ym. 2009). Tutkimuksissa ei ole aiemmin yritetty ennustaa plasman NEFA-pitoisuutta maidon MIR-spektristä ennustettujen rasvahappopitoisuuksien perusteella. McParland ym. (2011) tutki energiataseen ennustetta MIR-spektrin perusteella. McParlandin ym. (2011) tutkimuksessa MIR-spektristä ennustetun energiataseen keskiarvoinen ennustetarkkuus (ennustettujen ja havaittujen arvojen välisen regression selityssasteen neliöjuuri) oli 0,75 laktaatiokaudelle. McParlandin ym. (2012) tutkimuksessa energiataseen ennusteen tarkkuus MIR-spektrin perusteella oli 0,47 – 0,69.

Tässä tutkimuksessa regressiomalleja tarkasteltiin erikseen molemmille laktaatiokausille laktaatioviikkojen 2 ja 3 yhdistetystä aineistosta. Näytteiden ottaminen tuotoskauden alkuvuikoilla on perusteltua, sillä negatiivisin energiatase ajoittuu sekä Grossin ym. (2011) että Mäntysaaren ym. (2012) mukaan laktaatiokauden ensimmäisille viikoille. Tutkimuksessamme maidon C18:1c9-rasvahapon pitoisuus ja plasman NEFA-pitoisuus olivat suurimpia laktaatioviikon 2 näytteissä. Tämän perusteella olisi suositeltavaan ottaa maitonäyte laktaatioviikolta 2, jos käytetään vain yhtä maitonäytettä ennustamaan NEFA-pitoisuutta. Perustason (laktaatioviikko 20) NEFA-pitoisuuden vähentäminen

laktaatioviikkojen 2 ja 3 NEFA-pitoisuudesta ei tuonut malleihin muutosta, ja olisi laskenut havaintojen määrää, joten mallit muodostettiin suoraan laktaatioviikkojen 2 ja 3 tiedoista. Useamman kuin kahden selittäjän ennustemalleilla oli jonkin verran parempi selitysaste kuin kahden selittäjän ennustemalleilla. Molemmilla tuotoskausilla erot useamman kuin kahden selittäjän regressiomallien välillä olivat pieniä tuotoskausien sisällä. Erot eri rasvahappoyhdistelmien selitysasteiden ja AIC-arvojen välillä olivat pieniä, joten on luotettavinta käyttää ennustemalleissa rasvahappoja, joita on suuria pitoisuuksia. Huomioitavaa on, että laktaatioviikkojen 2 ja 3 maidon rasvapitoisuus korreloi mallin rasvahappojen pitoisuuksiin (Liite 5). Toisella tuotoskaudella rasvapitoisuuden korrelaatio oli suurempi kaikkiin mallin rasvahappoihin kuin NEFA-pitoisuuteen (Liite 6). Mallien selittävien tekijöiden korrelaatiosta kertova VIF-arvo ei kuitenkaan ollut yli hyväksyttävän tason (>10), mutta yhteys kannattaa muistaa ennustemallien ryhmiä vertailtaessa.

Tutkimuksessamme laskennallinen energiatase korreloi havaitun NEFA-pitoisuuden kanssa negatiivisesti ensimmäisellä tuotoskaudella 0,38 ja toisella tuotoskaudella 0,41 (Liite 6). Tämä on huomattavasti heikompi korrelaatio kuin tutkimuksessamme havaitun ja ennustetun NEFA-pitoisuuden korrelaatio molemmilla tuotoskausilla sekä C18:1c9- että C14:0- + C18:1c9-rasvahappojen pitoisuuksien ennustemalleilla (Kuvat 3, 4, 5 ja 7). Vastaavia tuloksia saivat Mäntysaari ym. (2016) aineistosta, joka oli osittain samaa kuin tässä tutkimuksessa käytetty. Mäntysaaren ym. (2016) tuloksissa korrelaatio ennustetun ja mitatun NEFA-pitoisuuden muutoksen välillä oli 0,77, kun ennustemallissa olivat selittävinä tekijöinä elopaino, kuntoluokka ja näiden muutokset yhdessä tuotospäivän ja maidon rasva-valkuaissuhteen kanssa. Mitatun NEFA-pitoisuuden muutoksen ja laskennallisen energiataseen välinen korrelaatio oli 0,69 Mäntysaaren ym. (2016) tutkimuksessa. Virhettä laskettuun energiataseeseen aiheuttaa se, että laskennassa käytetään lehmien keskiarvoista arvioitua energiantarvetta, joka ei ota huomioon lehmien välisiä eroja rehun hyväksikäytössä. Lisäksi energiantarpeen arviot saattavat olla vanhentuneita eivätkä päde täysin nykylehmille (Mäntysaari ym. 2016).

Kaikissa ennustemalleissa ennuste aliarvioi plasman korkeimpia NEFA-pitoisuuksia. Tämä johtui ainakin osittain NEFA-pitoisuuden vaihtelusta eikä pelkästään valituista selittäjistä. Ensimmäisen tuotoskauden suurempi vaihtelukerroin verrattuna toiseen tuotoskauteen johtui yksilöiden havaintojen suuremmasta hajonnasta ensimmäisellä tuotoskaudella, sekä mahdollisesti osin suuremmasta eläinmäärästä havaintoja

kerättäessä ja hajonnasta tuotoskauden sisällä. Mallien tarkkuus oli pääsääntöisesti hyvä. Ennustevirhe koostui tässä tutkimuksessa suurelta osin satunnaisvirheestä ja vähäisessä määrin kulmakerroinvirheestä. Ennustemallien kulmakerroinvirhe johtui käytännössä lehmistä, joilla NEFA-pitoisuus oli todella suuri ensimmäisillä viikoilla, vaikka laskennallinen negatiivinen energiatase ei ollut vakavampi kuin muillakaan. Myös satunnaisvirheen suuri osuus liittyy siihen, että NEFA-pitoisuus ei kuvaa pelkästään eläimen energiatasetta, vaan myös lehmän kokemaa stressiä (Brickner ym. 2007). Viikolle 20 mennessä erot lehmien NEFA-pitoisuuksien välillä olivat hävinneet. Ensimmäisessä laktaatiossa oli suurempi ennustevirhe, johtuen juuri suuremmasta eläinten välisistä eroista NEFA-pitoisuuksissa.

8. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen perusteella lehmän plasman NEFA-pitoisuuden voi tuotoskauden alkuvaiheessa ennustaa MIR-spektrin perusteella ennustetun maidon rasvahappopitoisuuden ja tuotospäivän perusteella johdetuista malleista. Ensimmäisen tuotoskauden eläinten plasman NEFA-pitoisuuden vaihtelu oli suurempaa sekä eläinten että yksilön näytteiden välillä, mikä aiheutti suuremman ennustevirheen. Laktaatiokauden ja rasvahappojen pitoisuuksien regressiokertoimissa oli eroja, mutta parhaissa ennustemalleissa olivat samat selittävät muuttujat molemmilla tuotoskausilla. Parhaiten yksittäisistä rasvahapoista NEFA-pitoisuutta ennusti maidon C18:1c9-rasvahapon pitoisuus. Useamman kuin kahden selittäjän regressiomalleista NEFA-pitoisuutta ennustivat parhaiten mallit, joissa olivat mukana tuotospäivän lisäksi C14:0- ja C18:1c9-rasvahappojen pitoisuus. Rasva-valkuaisuhde ennusti plasman NEFA-pitoisuutta huomattavasti heikommin kuin yhden tai kahden rasvahapon pitoisuuksia sisältävät mallit. Muiden selittäjien lisääminen malliin ei tuonut merkittävää etua tai parannusta ennustemalliin. Ennustemallit aliarvioivat plasman suurimpia NEFA-pitoisuuksia, mutta niistä voi päätellä lehmän negatiivisen energiataseen olemassaolon ja vakavuuden. Tutkimuksessa käytetyt ennustemallit ovat käyttökelpoisia tunnistettaessa lehmiä, joiden plasman NEFA-pitoisuus on suuri ja jotka ovat voimakkaasti negatiivisessa energiataseessa. Kyseiset mallit toimivat samankaltaisessa tuotantoympäristössä ilman rasvalisiä nurmisäilöruokinnalla oleville lehmille. Ennustemallien toimivuutta myöhemmille tuotoskausille pitää tutkia lisää.

9.KIITOKSET

Kiitos Tuomo Kokkoselle tuesta ja ohjauksesta, Juha Suomelle ja Viikin tutkimustilalle opintojen mahdollistamisesta työn ohessa, Nina Kairisalolle työhuoneen lainasta, sekä Teemu Lundgrenille tietokoneen lainasta ja teknisestä tuesta.

LÄHTEET

- AOAC 1990. Official methods of analysis. 15. painos. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- AOAC 1995. Official methods of analysis. 16. painos. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- Bauman, D & Griinari, J. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low – fat milk syndrome. *Livestock Production Science* 70: 15–29.
- Bauman, D & Griinari, J. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* 23: 203–227.
- Brickner, A., Rastani, R. & Grummer, R. 2007. Technical note: Effect of sampling protocol on plasma nonesterified fatty acid concentration in dairy cow. *Journal of Dairy Science* 90: 2219–2222.
- Buttchereit, N., Stamer, E., Junge, W & Thaller, G. 2011. Short communication: Genetic relationships among daily energy balance, feed intake, body condition score, and fat to protein ratio of milk in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 1586–1591.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. & Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie* 49: 181–205.
- Clarke, C., Fulkerson, W., Nandra, K., Barchia I. & Macmillan, K. 2005. The use of indicators to assess the degree of mobilisation of body reserves in dairy cows in early lactation on a pasture-based diet. *Livestock Production Science* 94: 199–211.
- De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M. & Penasa, M. 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science* 97: 1171–1186.
- Edmonson, A., Lean, I., Weaver, L., Farver, T. & Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 68–78.
- Friedel, K. 1990. Die schätzung des energetischen futterwertes von grobfutter mit hilfe einer cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages by means of a cellulose method]. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39: 78–86.
- Friggens, N., Ridder, C. & Løvendahl, P. 2007. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cow. *Journal of Dairy Science* 90: 5453–5467.
- Gross, J., van Dorland, H., Bruckmaier, R. & Schwarz, F. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 78: 479–488.

- Halmemies-Beauchet-Filleau, A. 2013. Role of forage species and conservation method in ruminal lipid metabolism, mammary lipogenesis and milk fatty acid composition in lactating cows. Helsinki: Unigrafia. 104 s.
- Heuer, C., van Straalen, W., Schukken, Y., Dirkzwager, A. & Noordhuizen, J. 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Science* 65: 91–105.
- Hopster, H., van der Werf, J., Erkens, J. & Blokhuis, H. 1999. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cow. *Journal of Animal Science* 77:708–714.
- Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293–323.
- Huida, L., Väättäinen, H. & Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silages as determined by oven drying and gas chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fenniae* 25: 215–230.
- Jorjong, S., van Kneegsel, A., Verwaeren, J., Val Lahoz, M., Bruckmaier, R., De Baets, B., Kemp, B., & Fievez, V. 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cow. *Journal of Dairy Science* 97: 7054–7064.
- Kokkonen, T., Taponen, J., Anttila, T., Syrjälä-Qvist, L., Delavaud, C., Chilliard, Y., Tuori, M. & Tesfa, A. 2005. Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1127–1141.
- Leroy, J., Bossaert, B., Opsomer, G. & Bols, P. 2011. The effect of animal handling procedures on the blood non-esterified fatty acid and glucose concentrations of lactating dairy cows. *The Veterinary Journal* 187: 81–84.
- Luke. 2015. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Luonnonvarakeskus, Jokioinen. Verkkojulkaisu: <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/>.
- Maurice-van Eijndhoven, M., Bovenhuis, H., Soyeurt, H. & Calus, M. 2013. Differences in milk fat composition predicted by mid-infrared spectrometry among dairy cattle breeds in the Netherlands. *Journal of Dairy Science* 96: 2570–2582.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, R.A., Sinclair, L.A. & Wilkinson, R.G. 2011. Animal nutrition. 7. painos. Harlow, Englanti: Pearson. 692 s.

- McParland, S., Banos, G., Wall, E., Coffey, M., Soyeurt, H., Veerkamp, R. & Berry, D. 2011. The use of mid-infrared spectrometry to predict body energy status of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 94: 3651–3661.
- McParland, S., Banos, G., McCarthy, B., Lewis, E., Coffey, M., O’neill, B., O’Donovan, M., Wall, E. & Berry, D. 2012. Validation of mid-infrared spectrometry in milk for predicting body energy status in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 95: 7225–7235.
- McParland, S., Lewis, E., Kennedy, E., Moore, G., McCarthy, B., O’Donovan, M., Butler, S., Pryce, J. & Berry, D. 2014. Mid-infrared spectrometry of milk as a predictor of energy intake and efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97: 5863–5871.
- Mäntysaari, P. ja Mäntysaari, E. 2010. Predicting early lactation energy balance in primiparous Red dairy cattle using milk and body traits. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A* 60: 79–87.
- Mäntysaari, P., Liinamo, A.-E. ja Mäntysaari, E. 2012. Energy efficiency and its relationship with milk, body, and intake traits and energy status among primiparous Nordic red dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95: 3200–3211.
- Mäntysaari, P., Kokkonen, T., Lidauer, M. ja Mäntysaari, E. 2016. Elopaino, kuntokuokka ja maidon pitoisuudet lehmän energiataseen kuvaajana. *Maataloustieteen Päivät 2016* (verkkojulkaisu). Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisu no 33. Toim. Nina Schulman ja Janne Helin. Viitattu 16.1.2018. Julkaistu 13.1.2016. Saatavilla Internetissä:
www.smts.fi/sites/smts.fi/files/MTP2016/M%C3%A4ntysaari_ym_2016.pdf.
 ISBN 978-951-9041-62-9.
- Nokka, Sanna. 2015. ProAgria: Tuotosseurannan tulokset 2014. Maidon ja nurmentuotannon tulosseminaari 15.4.2015. https://pohjois-savo.proagria.fi/sites/default/files/attachment/tuotosseuranta_2014_sanna_nokka.pdf. Viitattu 27.11.2017.
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97–111.

- Perfield II, J., Lock, A., Griinari, J., Sæbø, A., Delmonte, P. & Bauman, D. 2007. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 2211–2218.
- Reist, M., Erdin, D., von Euw, D., Tshuemperlin, K., Leuenberger, H., Chilliard, Y., Hammon, H., Morel, C., Philipona, C., Zbinden, Y., Kuenzi, N. & Blum, J. 2002. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 3314–3327.
- Rutten, M., Bovenhuis, H., Hettinga, K., van Valenberg, H. & van Arendonk, A. 2009. Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. *Journal of Dairy Science* 92: 6202–6209.
- Sjaunja, J., Baerve, L., Junkkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1991. A nordic proposal for and energy corrected milk (ECM) formula. Teoksessa: Gaillon, P. & Chabert, Y. (toim.) 1990. Performance recording of animals: State of the art. PUDOC, Wageningen, Alankomaat. EAAP Publications no 50: 156–157.
- Soyeurt, H., Dardenne, P., Dehareng, F., Lognay, G., Veselko, D., Marlier, M., Bertozzi, C., Mayeres, P. & Gengler, N. 2006. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science* 89: 3690–3695.
- Soyeurt, H., Dehareng, F., Gengler, N., McParland, S., Wall, E., Berry, D., Coffey, M. & Dardenne, P. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *Journal of Dairy Science* 94: 1657–1667.
- St-Pierre, N. 2001. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of Dairy Science* 84: 741–755.
- Stoop, W., Bovenhuis, H., Heck, J. & van Arendonk, J. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 92: 1469–1478.
- van Knegsel, A., van den Brand, H., Dijkstra, J., Tamminga, S. & Kemp, B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development* 45: 665–688.
- van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3588–3597.

Weiss, D., Helmreich, S., Möstl, E., Dzidic, A. & Bruckmaier, R. 2004. Coping capacity of dairy cows during the change from conventional to automatic milking. *Journal of Animal Science* 82:563–570.

LIITE 1. Aineiston NEFA- ja rasvahappopitoisuuksien keskiarvojen prosentuaaliset muutokset laktaatioviikoilla 2 ja 3 verrattuna laktaatioviikkoon 20.

	1. laktaatio		2. laktaatio	
	lv2	lv3	lv2	lv3
NEFA, mmol/L plasmassa	351,0	244,2	259,4	200,3
Maidon rasvahappopitoisuudet, mg/100 ml				
C4:0	26,9	13,6	25,4	15,4
C6:0	9,0	1,2	10,9	3,5
C8:0	-1,0	-4,9	6,0	1,3
C10:0	-15,1	-14,2	-2,9	-5,4
C12:0	-23,5	-21,4	-10,7	-11,9
C14:0	-16,2	-16,6	-8,9	-10,3
C14:1	-40,4	-38,0	-38,9	-33,7
C16:0	-7,2	-12,3	-6,1	-9,6
C16:1c	34,7	16,0	17,6	7,8
C17:0	23,0	11,3	22,0	11,7
C18:0	38,6	26,7	41,5	29,7
C18:1c9	55,1	36,2	39,8	29,6
C18:2	22,5	16,4	21,3	16,9
C18:2c9c12	32,4	25,4	23,5	20,9
C18:3c9c12c15	33,1	24,3	44,5	32,2
C18:2c9t11	12,5	-2,1	58,6	27,0
SAT	-0,8	-6,0	2,1	-2,5
MONO	45,7	28,9	34,9	24,5
POLY	28,6	20,1	38,3	26,5
INSAT	43,3	27,5	34,2	24,1
SCFA	4,1	-1,8	9,4	3,3
MCFA	-12,0	-15,0	-9,2	-11,2
LCFA	48,7	32,3	42,5	30,1
isoanteiso	-4,6	-7,6	-3,1	-4,0
omega3	35,7	26,0	47,3	32,5
omega6	24,2	18,4	24,2	19,4
ODD	0,2	-4,7	3,4	-1,3
Total trans	29,1	21,0	57,9	39,1
toC18:1	55,3	36,4	43,4	31,3
toC18:1trans	31,0	22,8	60,5	40,8
toC18:1c	54,1	35,7	39,2	29,4

LIITE 2. Ensimmäisen laktaatiokauden rasvahappojen keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimiarvot laktaatioviikoittain.

	Laktaatioviikko 2					Laktaatioviikko 3					Laktaatioviikko 20				
	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.
NEFA,mmol/L	245	0,605	0,320	0,160	1,951	254	0,462	0,247	0,101	1,631	111	0,134	0,070	0,036	0,419
Maidon rasvahappopitoisuudet, mg/100 ml															
C4:0	245	0,148	0,024	0,077	0,336	254	0,133	0,024	0,030	0,192	111	0,117	0,019	0,078	0,171
C6:0	245	0,083	0,017	0,042	0,228	254	0,077	0,015	0,024	0,116	111	0,076	0,013	0,050	0,110
C8:0	245	0,050	0,012	0,027	0,146	254	0,049	0,010	0,017	0,075	111	0,051	0,008	0,035	0,074
C10:0	245	0,105	0,033	0,046	0,311	254	0,107	0,027	0,036	0,188	111	0,124	0,022	0,079	0,193
C12:0	245	0,120	0,039	0,047	0,333	254	0,123	0,033	0,047	0,214	111	0,157	0,027	0,099	0,240
C14:0	245	0,443	0,090	0,244	1,083	254	0,441	0,085	0,154	0,688	111	0,529	0,073	0,359	0,765
C14:1	245	0,027	0,005	0,010	0,052	254	0,028	0,006	0,007	0,048	111	0,044	0,006	0,028	0,057
C16:0	245	1,295	0,218	0,634	2,827	254	1,225	0,244	0,319	1,904	111	1,396	0,218	0,883	2,033
C16:1c	245	0,083	0,021	0,026	0,156	254	0,071	0,020	0,012	0,136	111	0,061	0,010	0,040	0,120
C17:0	245	0,031	0,005	0,012	0,059	254	0,028	0,006	0,007	0,048	111	0,025	0,004	0,018	0,042
C18:0	245	0,605	0,123	0,175	1,435	254	0,554	0,120	0,063	0,930	111	0,437	0,083	0,260	0,823
C18:1c9	245	1,130	0,292	0,299	2,031	254	0,992	0,283	0,073	1,890	111	0,729	0,119	0,485	1,474
toC18:1	245	1,371	0,336	0,416	2,647	254	1,204	0,329	0,124	2,279	111	0,882	0,144	0,619	1,765
toC18:1c	245	1,212	0,311	0,325	2,178	254	1,067	0,301	0,091	2,034	111	0,786	0,127	0,526	1,589
C18:2	245	0,116	0,022	0,009	0,258	254	0,110	0,021	0,034	0,202	111	0,095	0,012	0,073	0,148
C18:2c9c12	245	0,079	0,014	0,023	0,168	254	0,075	0,013	0,035	0,140	111	0,060	0,008	0,043	0,093
C18:3c9c12c15	245	0,023	0,006	-0,006	0,064	254	0,022	0,005	0,004	0,041	111	0,017	0,004	0,009	0,031
C18:2c9t11	245	0,021	0,008	-0,011	0,045	254	0,019	0,008	-0,007	0,038	111	0,019	0,008	0,003	0,039
SAT	245	3,030	0,523	1,431	7,415	254	2,874	0,538	0,755	4,564	111	3,055	0,460	2,107	4,375
MONO	245	1,504	0,358	0,453	2,929	254	1,331	0,353	0,157	2,519	111	1,032	0,160	0,734	2,008
POLY	245	0,172	0,035	-0,021	0,351	254	0,161	0,035	0,044	0,274	111	0,134	0,023	0,085	0,216
INSAT	245	1,676	0,387	0,506	3,296	254	1,491	0,383	0,198	2,801	111	1,170	0,178	0,852	2,228
SCFA	245	0,395	0,081	0,210	1,062	254	0,372	0,070	0,125	0,561	111	0,379	0,061	0,262	0,527
MCFA	245	2,055	0,348	0,993	4,669	254	1,985	0,378	0,529	3,122	111	2,336	0,338	1,525	3,351
LCFA	245	2,304	0,494	0,793	4,720	254	2,051	0,492	0,275	3,661	111	1,550	0,249	1,081	2,908

LIITE 3. Toisen laktaatiokauden rasvahappojen keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimi- arvot laktaatioviikoittain.

	Laktaatioviikko 2					Laktaatioviikko 3					Laktaatioviikko 20				
	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.	N	Ka	Hajonta	Min.	Maks.
NEFA,mmol/L	79	0,473	0,176	0,126	1,080	82	0,395	0,163	0,133	0,891	38	0,132	0,041	0,065	0,237
Maidon rasvahappopitoisuudet, mg/100 ml															
C4:0	79	0,145	0,017	0,095	0,217	82	0,134	0,021	0,085	0,182	38	0,116	0,020	0,072	0,154
C6:0	79	0,081	0,012	0,049	0,115	82	0,076	0,013	0,045	0,103	38	0,073	0,013	0,045	0,098
C8:0	79	0,052	0,009	0,029	0,072	82	0,050	0,009	0,029	0,067	38	0,049	0,008	0,030	0,064
C10:0	79	0,115	0,027	0,054	0,175	82	0,112	0,025	0,063	0,165	38	0,118	0,021	0,076	0,174
C12:0	79	0,133	0,034	0,058	0,208	82	0,132	0,032	0,068	0,199	38	0,149	0,025	0,100	0,221
C14:0	79	0,467	0,082	0,281	0,647	82	0,460	0,084	0,256	0,633	38	0,513	0,072	0,334	0,679
C14:1	79	0,026	0,006	0,013	0,041	82	0,028	0,006	0,012	0,043	38	0,042	0,005	0,030	0,054
C16:0	79	1,305	0,218	0,781	1,857	82	1,256	0,232	0,619	1,725	38	1,389	0,218	0,893	1,911
C16:1c	79	0,069	0,014	0,048	0,134	82	0,063	0,013	0,035	0,096	38	0,058	0,010	0,037	0,084
C17:0	79	0,029	0,004	0,021	0,044	82	0,026	0,004	0,016	0,037	38	0,023	0,003	0,015	0,030
C18:0	79	0,587	0,083	0,425	0,934	82	0,538	0,093	0,327	0,779	38	0,415	0,073	0,262	0,575
C18:1c9	79	0,941	0,216	0,592	1,944	82	0,873	0,207	0,422	1,362	38	0,673	0,120	0,419	1,054
toC18:1	79	1,160	0,244	0,769	2,311	82	1,061	0,237	0,533	1,610	38	0,808	0,143	0,509	1,242
toC18:1c	79	1,012	0,231	0,634	2,087	82	0,941	0,221	0,452	1,464	38	0,727	0,129	0,457	1,132
C18:2	79	0,104	0,014	0,081	0,175	82	0,100	0,013	0,067	0,140	38	0,085	0,011	0,058	0,104
C18:2c9c12	79	0,071	0,010	0,053	0,120	82	0,070	0,009	0,050	0,095	38	0,058	0,008	0,041	0,070
C18:3c9c12c15	79	0,022	0,003	0,016	0,037	82	0,020	0,004	0,013	0,030	38	0,015	0,004	0,007	0,023
C18:2c9t11	79	0,018	0,006	0,006	0,033	82	0,015	0,007	-0,004	0,036	38	0,011	0,009	-0,014	0,029
SAT	79	3,038	0,442	1,899	4,230	82	2,899	0,487	1,579	3,821	38	2,974	0,453	1,885	3,921
MONO	79	1,280	0,257	0,886	2,525	82	1,182	0,250	0,640	1,786	38	0,950	0,157	0,603	1,399
POLY	79	0,156	0,021	0,122	0,244	82	0,142	0,022	0,094	0,198	38	0,112	0,021	0,060	0,152
INSAT	79	1,432	0,276	1,008	2,791	82	1,324	0,269	0,757	1,990	38	1,067	0,172	0,678	1,549
SCFA	79	0,402	0,060	0,234	0,539	82	0,380	0,064	0,229	0,506	38	0,368	0,061	0,231	0,478
MCFA	79	2,082	0,344	1,243	2,875	82	2,035	0,368	1,038	2,792	38	2,292	0,332	1,464	3,038
LCFA	79	2,035	0,348	1,518	3,730	82	1,857	0,354	1,059	2,730	38	1,428	0,242	0,895	2,050

**LIITE 4. Mitattujen ominaisuuksien korrelaatio plasman NEFA- pitoisuuteen
laktaatiokausittain ja –viikoittain.**

1. laktaatio				2. laktaatio			
	Lv 2	Lv 3	Lv 20		Lv 2	Lv 3	Lv 20
C4:0	0,254	0,242	0,199	C4:0	0,245	0,150	0,324
C6:0	0,019	0,063	0,131	C6:0	-0,111	-0,123	0,310
C8:0	-0,126	-0,065	0,128	C8:0	-0,307	-0,268	0,281
C10:0	-0,262	-0,194	0,099	C10:0	-0,454	-0,396	0,211
C12:0	-0,300	-0,247	0,089	C12:0	-0,498	-0,438	0,140
C14:0	-0,212	-0,168	0,141	C14:0	-0,411	-0,367	0,152
C14:1	-0,127	-0,097	-0,013	C14:1	-0,349	-0,428	-0,131
C16:0	0,039	0,030	0,201	C16:0	-0,230	-0,236	0,170
C16:1c	0,458	0,418	0,176	C16:1c	0,583	0,249	-0,042
C17:0	0,302	0,268	0,159	C17:0	0,371	0,088	0,017
C18:0	0,258	0,324	0,355	C18:0	0,451	0,297	0,183
C18:1c9	0,464	0,471	0,307	C18:1c9	0,736	0,492	0,114
toC18:1	0,447	0,460	0,289	toC18:1	0,741	0,483	0,109
toC18:1c	0,462	0,470	0,313	toC18:1c	0,735	0,493	0,117
C18:2	0,168	0,297	0,194	C18:2	0,537	0,213	0,068
C18:2c9c12	0,199	0,333	0,297	C18:2c9c12	0,490	0,301	0,194
C18:3c9c12c15	0,077	0,234	0,091	C18:3c9c12c15	0,461	0,120	-0,026
C18:2c9t11	0,095	0,111	-0,105	C18:2c9t11	0,326	0,110	-0,203
SAT	-0,028	0,065	0,203	SAT	-0,186	-0,170	0,192
MONO	0,436	0,449	0,279	MONO	0,725	0,450	0,093
POLY	0,123	0,250	0,046	POLY	0,521	0,167	-0,084
INSAT	0,421	0,441	0,258	INSAT	0,725	0,439	0,075
SCFA	-0,144	-0,005	0,137	SCFA	0,232	-0,202	0,282
MCFA	-0,092	-0,021	0,180	MCFA	0,277	-0,283	0,147
LCFA	0,392	0,423	0,282	LCFA	0,693	0,428	0,147
Rasva/proteiini- suhde	0,233	0,318	0,397	Rasva/proteiini- suhde	0,359	0,269	0,207
Tuotospäivä	-0,158	-0,074	-0,161	Tuotospäivä	-0,198	0,057	0,115
Maitotuotos (kg/ pv)	0,095	0,198	-0,133	Maitotuotos (kg/ pv)	0,536	0,345	0,108
Rasvapitoisuus	0,398	0,400	0,356	Rasvapitoisuus	0,228	0,077	0,048
Proteiinipitoisuus	0,009	-0,138	-0,285	Proteiinipitoisuus	-0,328	-0,449	-0,172
Laktoosipitoisuus	-0,176	0,065	-0,078	Laktoosipitoisuus	0,169	0,216	-0,017
EKM (kg/ pv)	0,235	0,344	-0,046	EKM (kg/ pv)	0,592	0,350	0,122
Syönti (MEI, MJ/ pv)	-0,135	-0,033	0,008	Syönti (MEI, MJ/ pv)	-0,057	0,069	0,212
Elopaino (kg)	0,132	0,023	0,019	Elopaino (kg)	0,144	0,120	0,155
Painon muutos (kg)	-0,345	-0,296	-0,290	Painon muutos (kg)	-0,304	-0,311	-0,199
Energiatase (MJ ME/ pv)	-0,381	-0,368	0,049	Energiatase (MJ ME/ pv)	-0,536	-0,239	0,046
Kuntoluokka	0,131	0,050	-0,003	Kuntoluokka	0,116	-0,017	0,111

LIITE 5. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selittävien tekijöiden korrelaatiot toisiinsa ensimmäisellä tuotoskaudella yhdistettynä laktaatioviikoilta 2 ja 3.

	NEFA	DIM	Rasvapit.	Valkuaispit.	ECM	MEI	EB	C4:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:1c	C18:0	C18:1c9	C18:2c9c12	FPR
NEFA	1,000	-0,262	0,428	0,057	0,057	0,222	-0,156	-0,383	0,256	-0,259	-0,297	-0,209	0,457	0,321	0,494	0,257
DIM	-0,262	1,000	-0,252	-0,600	0,200	0,328	0,137	-0,345	-0,044	-0,014	-0,055	-0,265	-0,249	-0,240	-0,188	0,029
Rasvapit.	0,428	-0,252	1,000	0,235	0,245	-0,114	-0,349	0,698	0,198	0,153	0,365	0,719	0,726	0,690	0,638	0,690
Valkuaispit.	0,057	-0,600	0,235	1,000	-0,237	-0,247	-0,047	0,243	0,283	0,299	0,284	0,105	0,099	0,028	-0,004	-0,270
ECM	0,222	0,200	0,245	-0,237	1,000	0,427	-0,563	0,100	-0,029	-0,057	-0,022	0,107	0,159	0,164	0,126	0,264
MEI	-0,156	0,328	-0,114	-0,247	0,427	1,000	0,486	-0,143	0,159	0,155	0,094	-0,272	-0,138	-0,279	-0,147	0,024
EB	-0,383	0,137	-0,349	-0,047	-0,563	0,486	1,000	-0,221	0,182	0,200	0,121	-0,351	-0,262	-0,409	-0,234	-0,198
C4:0	0,256	-0,345	0,698	0,243	0,100	-0,143	-0,221	1,000	0,422	0,337	0,593	0,665	0,847	0,657	0,710	0,708
C10:0	-0,259	-0,044	0,198	0,283	-0,029	0,159	0,182	0,422	1,000	0,988	0,929	-0,103	0,203	-0,204	0,286	0,172
C12:0	-0,297	-0,014	0,153	0,299	-0,057	0,155	0,200	0,337	0,988	1,000	0,926	-0,161	0,124	-0,265	0,218	0,103
C14:0	-0,209	-0,055	0,365	0,284	-0,022	0,094	0,121	0,593	0,929	0,926	1,000	0,105	0,414	0,013	0,418	0,369
C16:1c	0,457	-0,265	0,719	0,105	0,107	-0,272	-0,351	0,665	-0,103	-0,161	0,105	1,000	0,806	0,959	0,811	0,689
C18:0	0,321	-0,249	0,726	0,099	0,159	-0,138	-0,262	0,846	0,203	0,124	0,414	0,806	1,000	0,840	0,831	0,814
C18:1c9	0,494	-0,240	0,690	0,028	0,164	-0,279	-0,409	0,657	-0,204	-0,265	0,013	0,959	0,840	1,000	0,789	0,688
C18:2c9c12	0,282	-0,188	0,638	-0,004	0,126	0,126	-0,147	-0,234	0,710	0,286	0,218	0,418	0,811	0,831	1,000	0,766
FPR	0,257	0,029	0,690	-0,270	0,264	0,024	-0,198	0,708	0,172	0,103	0,369	0,689	0,814	0,688	0,766	1,000

LIITE 6. Useamman kuin kahden selittävän muuttujan regressiomallien selittävien tekijöiden korrelaatiot toisiinsa toisella tuotoskaudella yhdistettynä laktaatioviikoilta 2 ja 3.

	NEFA	DIM	Rasvavit.	Valkuaispit.	ECM	MEI	EB	C4:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:1c	C18:0	C18:1c9	C18:2c9c12	FPR
NEFA	1	-0,227	0,189	-0,220	0,427	-0,081	-0,410	0,244	-0,402	-0,451	-0,367	0,450	0,407	0,631	0,409	0,282
DIM	-0,227	1	-0,219	-0,557	0,164	0,558	0,257	-0,294	-0,054	-0,025	-0,041	-0,266	-0,280	-0,184	-0,089	0,124
Rasvavit.	0,189	-0,219	1	0,309	0,133	0,018	-0,107	0,738	0,405	0,351	0,498	0,629	0,769	0,501	0,566	0,554
Valkuaispit.	-0,220	-0,557	0,399	1	-0,449	-0,217	0,224	0,286	0,378	0,393	0,390	0,076	0,164	-0,163	-0,210	-0,396
ECM	0,427	0,164	0,133	-0,449	1	0,139	-0,712	0,066	-0,335	-0,370	-0,326	0,207	0,142	0,376	0,209	0,273
MEI	-0,081	0,558	0,018	-0,217	0,139	1	0,580	-0,048	0,159	0,169	0,151	-0,179	-0,038	-0,131	-0,029	0,135
EB	-0,410	0,258	-0,107	0,224	-0,712	0,580	1	-0,095	0,359	0,393	0,352	-0,292	-0,142	-0,395	-0,198	-0,142
C4:0	0,244	-0,294	0,738	0,286	0,066	-0,048	-0,095	1	0,418	0,335	0,524	0,676	0,852	0,582	0,565	0,655
C10:0	-0,402	-0,054	0,405	0,378	-0,335	0,159	0,359	0,418	1	0,993	0,968	-0,027	0,218	-0,280	0,197	0,298
C12:0	-0,451	-0,025	0,351	0,393	-0,370	0,169	0,393	0,335	0,993	1	0,960	-0,076	0,150	-0,341	0,146	0,235
C14:0	-0,368	-0,041	0,498	0,390	-0,326	0,151	0,352	0,524	0,968	0,960	1	0,121	0,356	-0,153	0,293	0,412
C16:1c	0,450	-0,266	0,629	0,076	0,207	-0,179	-0,292	0,676	-0,027	-0,076	0,121	1	0,803	0,907	0,773	0,664
C18:0	0,407	-0,280	0,769	0,164	0,142	-0,038	-0,142	0,852	0,218	0,150	0,356	0,803	1	0,789	0,732	0,724
C18:1c9	0,631	-0,184	0,501	-0,163	0,376	-0,131	-0,395	0,582	-0,280	-0,341	-0,153	0,907	0,789	1	0,759	0,646
C18:2c9c12	0,409	-0,089	0,566	-0,210	0,209	-0,029	-0,198	0,565	0,197	0,146	0,293	0,773	0,732	0,759	1	0,824
FPR	0,282	0,124	0,554	-0,386	0,273	0,135	-0,142	0,655	0,298	0,235	0,412	0,664	0,724	0,646	0,824	1